

生命科学实验指南系列



植物生物学与生态学实验

高玉葆　石福臣 等 编著



科 学 出 版 社

生命科学实验指南系列·典藏版





科学出版中心 生物分社
联系电话：010-64012501
E-mail：lifescience@mail.sciencep.com
网址：http://www.lifescience.com.cn

销售分类建议：分子生物技术



赛拉艾芙
生命科学订阅号



定价（全套）：4500.00元

生命科学实验指南系列·典藏版

植物生物学与生态学实验

高玉葆　石福臣　等　编著

科学出版社
北京

内 容 简 介

“生命科学实验指南系列”图书均出自名家，包括众多从 Cold Spring Harbor Laboratory Press 和 John Wiley & Sons 等国际知名出版社引进的实验室必备工具书，是生命科学领域最先进、实用、权威的实验手册类优秀图书。该系列图书简单明了，囊括了全世界最著名的生物类实验室操作方法，无论是初学者还是需要深入研究的科研工作者都能从中获益。该系列图书在读者群中有较高的知名度和美誉度，特别是以《分子克隆实验指南》和《精编分子生物学实验指南》为代表，堪称经典，分别被喻为生命科学领域的“蓝宝书”和“红宝书”。现挑选其中的精品集结成典藏版。

图书在版编目（CIP）数据

生命科学实验指南系列：典藏版/雷东锋等编著. —北京：科学出版社，2016

ISBN 978-7-03-047486-5

Ⅰ.①生… Ⅱ.①雷… Ⅲ. ①生命科学–实验–指南 Ⅳ.①Q1-0

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 043878 号

责任编辑：王 静 李 悦

责任印制：张 伟 / 封面设计：刘新新

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码：100717

http://www.sciencep.com

北京厚诚则铭印刷科技有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2016 年 7 月第 一 版 开本：787×1092 1/16

2016 年 7 月第一次印刷 印张：1310 1/2

字数：31 074 000

定价：4500.00 元

(如有印装质量问题，我社负责调换)

前　言

植物生物学是在传统的植物解剖学、植物分类学和植物生理学的基础上发展起来的。尽管在教学安排上很多学校设置有植物生物学这门课程，并有多部《植物生物学》的参考用书出版，有的也将植物生态学内容纳入其中，但是在内容体系上仍然离不开上述传统课程的核心部分。尤其是实验课各部分内容更是相对独立，因此有必要编著一部内容丰富、便于使用的实验指导书。

本书可作为综合性大学生物科学专业的实验指导用书，同时兼顾社会需求，因此本书力求内容全面，理论与实际密切结合，使学生从中获得较系统坚实的基础知识和专业知识，同时培养学生的实验技能，提高分析问题和解决问题的能力。

本书分 4 个部分，共 50 个实验，除包括植物生物学与生态学中的基础性实验和研究性实验外，还在第三部分中设计了实验 38、实验 39 和实验 40 三个综合性实验。本书实验 1~9 由江莎编写，实验 10~19 由石福臣、阮维斌编写，实验 20~40 由朱晔荣、任安芝、王淑芳、王勇编写，实验 41~50 由高玉葆、陈磊、赵念席编写，附录部分由江莎和朱晔荣编写，全书由高玉葆教授和石福臣教授统稿。

本书在付梓之际，首先感谢各位作者的辛勤努力。感谢南开大学教务处和研究生院在教材立项和出版方面的鼎立支持。本书是作者所在南开大学生物科学专业团队对过去多年相关实验教学内容的总结。在编写过程中，参考了国内外的大量相关资料，由于篇幅所限恕不能一一列出。由于时间仓促和水平有限，书中难免有疏漏之处，真诚希望广大读者批评指正。

编　者

2007 年 12 月

目　录

第四部分 生态篇



第一部分

解剖篇

实验 1　光学显微镜的构造和使用

【实验目的】

1. 了解光学显微镜的构造和功能。

2. 正确掌握显微镜的使用方法。

【实验材料】

1. 永久制片

2. 新鲜材料

小型花、种子等植物。

【器材和试剂】

1. 器材

光学显微镜、实体解剖镜、载玻片、盖玻片、镊子、滤纸、擦镜纸。

2. 试剂

香柏油、乙醚、乙醇。

【实验内容与步骤】

1. 生物显微镜的构造和使用

（1）构造

显微镜的种类很多，但基本构造相同，都是由机械和光学两部分组成（图 1-1）。

① 机械部分：包括镜座、镜柱、镜臂、镜筒、焦距调节器、载物台六个部分。

镜座：是显微镜基部的底座，起支持及固定镜体的作用。

镜柱：直立的柱，它与镜座相连，上接镜臂及载物台。

镜臂：拿取显微镜时手握之处，上连镜筒，下连镜柱。

镜筒：与镜臂相连的中空的圆形长筒，上连目镜，下连物镜转换器。镜筒的作用是保护成像的光路。

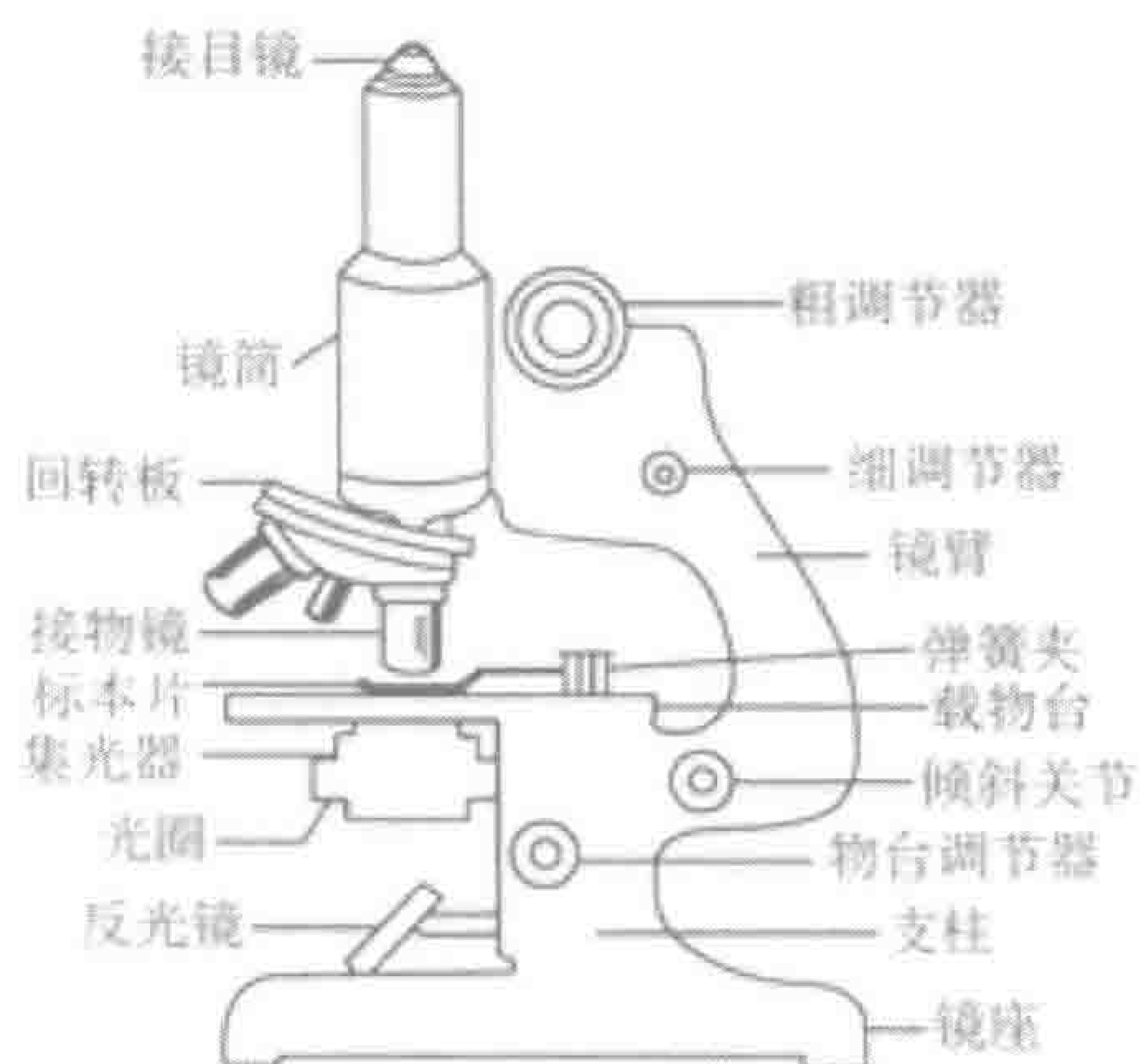


图 1-1　生物显微镜结构图

焦距调节器：分粗调节器与细调节器。粗调节器位于镜柱上的两个大旋钮，用于较大幅度地升降物台，以调节物镜与标本之间的距离来获得合适的焦距；细调节器在粗调节器的轴心，用以更精细地调节焦距，使用时，一般旋转不可超过一周。若遇到向前方（或后方）不能旋转时可向相反方向转动数圈，然后用粗调节器调整，调整后再旋转细调节器。

载物台：是方形的承载标本玻片的平台，中央有一圆孔，称通光孔，便于通过光线。

载物台后侧有一机械移动器（推进器），是一种移动标本玻片的机械装置，可使玻片标本向前后左右移动，用以调整玻片标本的位置。

② 光学部分：是构成显微镜的主要部分，由成像系统与照明系统组成。成像系统包括物镜和目镜；照明系统包括反光镜及聚光器。

目镜：位于镜筒的上端，直接与人的眼目相接，可将物镜放大的像进一步放大。它由两块透镜组成（其中之一常常附有一个指针，用于指示观察的目的物），常常备有几个倍数不同的目镜（5×、10×、20×），根据需要可以更换使用，放大倍数刻在目镜金属筒上，目镜越长其放大倍数越小。

视度圈：直接与目镜相连，旋转时可调节目镜与物体的距离，使像更加清晰。

物镜：是决定显微镜质量的最重要的部件，由嵌于金属筒内的数组透镜组成。有三个或四个不同倍数的物镜，放大倍数刻在物镜金属筒上（如4×、10×、20×、40×、100×），习惯上把放大倍数为10×以下的物镜称为低倍镜，40×~55×的物镜称为高倍镜。此外还有油浸物镜（简称油镜），放大倍数为100×，物镜的金属筒越长放大倍数越大，镜头与标本间的距离越近。

聚光器：位于载物台下方的中央部分，由数个透镜组成，其作用是聚集光线，使射入镜筒的光线增强并增加标本的亮度。聚光器可用调节螺旋进行上下调节，以求适宜光度，聚光器向下降落，明亮度降低；向上移动，亮度加强。聚光器的下面附有虹彩光圈，上有操纵杆，利用操纵杆可以调节光的强弱。

反射镜：位于聚光器下方，反射镜具有轮转关节，可以改变光线的方向，使光线射向聚光器（反射镜有平凹两面，可以上下旋转，凹面镜聚光强，多在弱光或有障碍物的地方使用，平面镜光线均匀，多在强光时使用），用电光源时可将其取下。

照明光源：显微镜的成像质量与照明光源有密切联系，显微镜的照明可用电光源和天然光源。电光源安装在显微镜的底座里，由一个灯泡和一组棱镜组成。灯泡发出的光经一组棱镜折射后，先后经过底座上一个通光孔、聚光器、物体、物镜、镜筒、目镜等，最后到达观察者的眼睛。底座的侧面有一个光源开关和一个光强调节器，底座的通光孔处安装有一个金属圈，必要时，可以将黄色或蓝色等滤光玻片放于其中，以改变光源灯的色调，一般不使用。人工光源还有显微镜灯、日光灯或普通台灯，天然光源是太阳光。在使用外加显微镜灯、日光灯、台灯和太阳光作光源时，不得使用显微镜本身的电光源，此外，还需要装上反光镜。

（2）显微镜的成像原理

光学显微镜是利用光学的成像原理观察植物体的结构。首先光射到聚光镜上，把光线汇集成束，穿过标本制片，进入到物镜的透镜上。经过物镜将制片上的像作第一次放大，此为倒立的实像，这一倒立的实像经过目镜第二次放大，形成眼睛在目镜中看到的最后放大的倒立的虚像。

（3）使用方法

显微镜的使用包括两个方面：光线的调节和焦距的调节，使用步骤如下。

① 显微镜的携取：从镜箱内取出显微镜时要用右手紧握镜臂，左手托住镜座并保持平衡状态，切勿只用一只手提取，以免目镜掉落或与它物相碰。显微镜取出后，将其放在离桌边 3~4cm 处的左前方，左手绘图者与此相反。

② 光源调节：一般情况下可用电光源。使用其他光源时，需装上反光镜以调节光强度。对光时须用低倍镜对着通光孔，通过目镜一边观察视野的明亮度，一边调节反光镜，使视野中的颜色均匀而明亮为止。

使用显微镜观察时应该首先使用低倍镜然后再使用高倍镜。

③ 低倍镜使用：观察任何标本都须先用低倍镜，因低倍镜视野范围大，容易发现标本与找到需观察的部位。低倍镜使用步骤如下：首先把制好的切片放在载物台上，用压片夹卡住切片，使用推进器将切片中的标本正对准通光孔中央。然后调节低倍物镜与标本的距离，用双眼从侧面看物镜，使其下降至距标本大约 5mm。再用粗调节器定焦距，用双目通过目镜注视视野，同时用粗调节器使镜筒慢慢上升，直到能清楚地看到标本为止。用显微镜观察时，一定要两眼睁开，以减少眼睛疲劳。为了使物像更清楚，此时，可以用细调节器轻微转动以得到更清楚的物像为止。

④ 高倍镜的使用：在低倍镜下需要对较小物体或细微结构进行观察时，可使用高倍镜，步骤如下：首先将在低倍镜下找到的目标移至视野的最中心，小心地转动镜头转换器，换低倍镜为高倍物镜。最后，旋转细调节器直至视野中的物像清晰为止。

⑤ 油镜的使用：用高倍镜不能满足需要时需用油镜，使用方法如下：先用低倍镜找到所要观察的目的物并将其移向视野中心。然后换高倍镜调整焦点（按上述④），将要观察的部分移至视野最中央，再换油镜观察。使用油镜前，需在盖玻片上滴一滴镜油（香柏油），将油镜移至镜筒下方，慢慢上升载物台，将油镜浸入油滴中，从侧面观察让油镜头几乎与玻片接触为止，然后通过目镜观察，再用细调节器调制物像清晰为止。油镜使用完毕，须立即将镜头上的香柏油擦净。具体方法是用棉棒或镜头纸蘸少许乙醚与无水乙醇的混合液（7:3）擦净镜头。香柏油干燥后不易擦净，且易损坏镜头。尽量不要使用二甲苯，因为二甲苯能够溶解固定镜头用的胶，日久造成镜片脱落。

⑥ 显微镜使用完毕后，旋转粗调节器，使载物台下降，取下玻片标本，然后转动镜头转换器，使两物镜头之间的部分对着通光孔，上升载物台，最后将显微镜置于镜箱中。

2. 体视显微镜的构造和使用

（1）体视显微镜的结构

体视显微镜由一对斯密特棱镜、一组大物镜、一组小物镜以及一对目镜共 4 部分及组成。

（2）基本原理

视观察物体经调焦使其处于大物镜的焦面上，然后被小物镜收敛和被斯密特棱镜折射后，成像在目镜的焦面上。斯密特棱镜使光束转向并使像倒转，故在目镜焦面上的像是与物体一致的正像，此像经目镜放大后为我们所观察。由于肉眼通过两目镜以不同的角度观察物体，使像具有立体感。

（3）使用方法

① 打开光源，调节聚光装置至所需亮度。

② 转动棱镜罩壳，调整两目镜之间的距离，使其与操作者两眼间的距离相一致。

③ 将标本放在底座中央，转动焦距调节器使左光路成像清晰；再转动视度圈，使右边光路成像清晰。

④ 调换目镜可获得不同倍率下的物像。

【注意事项】

1. 携取显微镜时，须一手握住镜臂，一手托住镜座。

2. 显微镜各部分要保持清洁，若镜头上有灰尘时，必须用软绸布或擦镜纸轻拭之；金属部分如有灰尘污垢，可用纱布轻轻擦拭；切勿用手巾更不可用手指拭之。

3. 观察制片时，一定要先使用低倍镜，把要观察的目的物放在视野的正中央，可以先看到一个全貌。具有一般的概念后，选定要放大观察的部分，再换高倍镜加以仔细地观察。

4. 标本要加盖玻片，然后观察，载玻片上的水滴、药液、乙醇等切勿过多，以免触及载物台或腐蚀镜头。

5. 调换载玻片时，须将载物台下降，转动镜头转换器，将高倍镜换成低倍镜，取出玻片，换上新玻片，然后再从低倍镜的观察开始至高倍镜观察。

6. 显微镜有不灵活之处，万不可用力转动，遇有障碍立即报告教师，切勿自行修理，以免扩大损坏处，绝对不可玩弄和拆卸显微镜。

【思考与作业】

1. 显微镜的构造分哪几部分？各部分有什么作用？

2. 反复练习使用低倍镜及高倍镜观察切片，使用时应特别注意什么问题？

3. 如何计算显微镜的放大倍数？你现在所用的显微镜可以放大多少倍？

4. 使用显微镜的过程中，应做好哪些保养工作？应注意哪些问题？

实验 2　植物细胞

【实验目的】

1. 了解植物细胞的基本构造。

2. 了解植物细胞的原生质流动现象和胞间连丝。

3. 了解细胞贮藏物质和细胞壁的形态及一般的鉴别方法。

4. 掌握植物细胞有丝分裂过程中各个时期的特点。

5. 掌握徒手切片技术及临时装片的制作。

6. 掌握生物绘图的基本技术。

【实验材料】

1. 永久制片

洋葱根尖纵切片、柿胚乳切片、蓖麻种子纵切片、松茎纵切片、橡皮树叶横切片。

2. 新鲜材料

洋葱、番茄、红辣椒、马铃薯、青椒、芝麻、大葱、天竺葵茎、橡皮树叶、秋海棠叶柄、绿鸭跖草茎、紫鸭跖草茎、橘子皮。

【器材和试剂】

1. 仪器：显微镜、酒精灯、烧杯、棕色瓶、擦镜纸、玻璃棒、镊子、解剖针、载玻

片、盖玻片、刀片、培养皿、吸水纸、滴管、纱布、真空泵、样品瓶。

2. 器材：I-KI 溶液、蒸馏水、饱和食盐水、苏丹Ⅲ、碘氯化锌溶液、5%~10%间苯三酚、浓盐酸（36%~38%）、碱性品红、1mol/L HCl、70%及 50%的乙醇、中性树胶、纯乙醇、二甲苯、FAA 固定液。

【实验内容与步骤】

1. 光学显微镜下植物细胞的观察

（1）洋葱表皮细胞的观察

取洋葱用解剖刀切成4~8瓣。取其中的一片肉质鳞片，用刀在其内表皮上划 3~5mm^2 的小格数个，然后用镊子撕取一小格的薄膜置于载玻片的 1 滴蒸馏水中（表面朝上），盖上盖玻片。再将多余的水用滤纸吸干，放在低倍镜下观察，可见一些网格状结构，即为细胞。在低倍镜下找到最清晰的几个细胞，然后换成高倍镜观察，可观察到以下结构。

① 细胞壁：为植物细胞所特有，包在原生质体的最外层，在高倍镜下调节细调节器可见细胞壁为三层结构，中间的一层为胞间层，位于胞间层两侧的分别为相邻两个细胞的初生壁。

② 细胞质：在生活细胞中为无色透明的、半流动的胶体，其中含有许多颗粒，在成熟细胞中细胞质被挤到紧贴细胞壁的位置上形成一薄层。用细调节器反复调节可观察到细胞质与液泡的界面，当视野较暗时，可以观察到白色体。

③ 细胞核：细胞核一般为圆球形，颜色较深，始终包埋在细胞质中。在成熟细胞中，细胞核位于细胞的边缘，紧贴细胞壁，可观察到核内有 1~3 个核仁。

④ 液泡：液泡很大，占据了细胞中央的大部分体积，每个细胞中有一个或几个液泡，假如有一个液泡时，一般居于细胞中央，细胞质被压向细胞壁。假如在细胞中有几个液泡，那么细胞质像细带一样悬挂在细胞中，细胞质中的颗粒就能与清澈的细胞液的界面分出来。

上述结构如果观察到的界限不太明显，可将装片从显微镜上取下后，从盖玻片的一侧滴 1 滴碘-碘化钾溶液（这时细胞已被杀死），用滤纸吸取多余的液体，使材料染色后再重复上述观察过程。

（2）番茄果肉细胞的观察

用解剖针挑取番茄果肉细胞，置于载玻片上的一滴蒸馏水中，并将其分散开，盖上盖玻片，放在低倍镜下观察，可见圆球状的离散的果肉细胞。由于成熟果肉细胞之间的胞间层已经溶解，所以能够清楚地看到每个细胞的壁，如果在制片过程中揉皱了细胞，那么在细胞的细胞壁上能看到一条条褶皱。在这种细胞中同样可以看到细胞质、细胞核与很大的液泡。此外，还可见细胞质中橙红色的颗粒，即为有色体。与洋葱表皮细胞相比较可以了解细胞形态的多样性。

2. 质体的观察

质体是植物细胞特有的一种细胞器，根据色素的有无与不同可分为叶绿体、有色体与白色体。

（1）叶绿体的观察

叶绿体主要存在于植物体有绿色的部分，是植物体进行光合作用的细胞器。用绿色

的鸭趾草茎或叶做徒手切片，可见细胞内绿色的颗粒即为叶绿体，也可用玉米叶进行观察。

（2）有色体的观察

有色体存在于根、茎、果实或花瓣中。取红辣椒果肉少许，做成临时装片，可见橙红色的小颗粒即为有色体。用胡萝卜的根做徒手切片也可观察到其中的有色体。

（3）白色体的观察

白色体是不含色素的一类质体，主要存在于幼嫩组织中或者不见光的部分，在有些植物的叶和茎中也可见。用鸭趾草茎做徒手切片或撕取其叶表皮细胞均可见白色体。洋葱表皮细胞中也可见到白色体。

3. 植物细胞的代谢产物

细胞在生命活动过程中，原生质不断进行新陈代谢所产生的代谢产物叫细胞内含物，包括储藏物质和代谢废物，它们存在于细胞质或液泡中。

（1）淀粉

淀粉是植物体中最常见的一种储藏物质，在质体的造粉体中发育形成。马铃薯块茎的薄壁组织中充满淀粉，是观察淀粉粒的理想材料。用马铃薯块茎做徒手切片或直接用镊子刮取去皮后块茎表面，将切片或刮取物置于载玻片的 1 滴蒸馏水中，放在镜下观察，可见淀粉粒的形态。每个淀粉粒上可以看到呈同心圆排列的轮纹和偏心的脐点。马铃薯中有简单淀粉粒、复合淀粉粒和半复合淀粉粒，其中，最常见的是简单淀粉粒，后两种较少。加少许碘化钾溶液后，淀粉粒呈蓝紫色反应。

（2）脂肪

植物体内的脂肪常以油滴的形式存在于细胞质中。油滴遇苏丹Ⅲ呈黄色反应。把芝麻、花生或向日葵种子放在载玻片上，用镊子柄将其捻碎，去掉残渣，加 1 滴苏丹Ⅲ染液，封片后放在低倍镜下观察，可见橙红色的圆球状的油滴。如颜色不明显可在酒精灯下微加热。

（3）蛋白质

储藏的蛋白质常以糊粉粒的形式存在，用蓖麻种子永久制片可以观察到胚乳当中的糊粉层，它是一层包裹着圆形球晶体和多角形拟晶体的膜。

（4）晶体：植物细胞的代谢产物之一，有草酸钙及碳酸钙结晶，前者较常见。

① 单晶的观察：取干的膜质的大葱鳞叶剪成 3~5mm^{2}小片，放在 30% 的甘油中浸泡 20min，再取出放在载玻片上的一滴蒸馏水中，置于低倍镜下观察可见细胞中的长柱形单晶体。

② 针晶的观察：也属于单晶的一种，用紫露草茎做徒手切片，可见针晶。

③ 簇晶的观察：取秋海棠叶柄做徒手切片，在低倍镜下可观察到簇晶。

④ 钟乳体的观察：上述结晶均为草酸钙结晶，在橡皮树叶的横切片中，可以观察到倒挂在上表皮细胞中的碳酸钙结晶——钟乳体。

（5）花青素

花青素溶解在细胞液中的色素，能使植物的茎叶花果实呈现各种颜色。用紫鸭跖草等具有颜色的叶，取表皮制成临时装片，在显微镜下可以观察到其均匀地分布于液泡中。

（6）油滴

取橘子皮做徒手切片，可以观察到油囊中的油滴。

4. 植物细胞的有丝分裂

取洋葱根尖纵切永久制片，观察植物细胞有丝分裂的各个时期，由于每个细胞的有丝分裂进行的不同步，因此，在一张切片上可观察到不同的时期。

观察时，首先在低倍镜下找到根尖的分生区，然后，选择各个时期有特征的典型细胞，移到视野的中央，转换成高倍镜观察。

（1）间期

是细胞有丝分裂前的准备阶段，是能量和物质的复制阶段，该时期细胞近于等径、核大、质浓、核结构均匀一致、核仁清晰。

（2）前期

自细胞核开始消失到形成染色体的期间，细胞核的形态已不存在，出现了染色深而小的染色体，前期快结束时，核仁、核膜消失，纺锤丝开始出现。

（3）中期

染色体短而粗，成对的染色体并列在细胞中央形成的赤道板上，两条染色单体彼此松开，纺锤体已形成，此时为中期，是计算染色体数目的最佳时期。

（4）后期

一对染色体在着丝粒处分开形成两条染色单体，并分别向两极移动，成为两组子染色体，向两极移动的每组子染色体的数目与母细胞染色体数相同。

（5）末期

染色体到达两极后解螺旋呈现均一状态，核仁、核膜重新出现，形成了两个子核，与此同时，两个子核中间出现了细胞板，它将两个子核分开，形成了两个子细胞。

5. 植物细胞壁和胞间连丝

（1）细胞壁的化学成分

① 纤维素：切取一小块洋葱表皮放在载玻片上，加1滴碘氯化锌溶液，盖上盖玻片放在低倍镜下观察。胞间层被染成淡黄色，细胞壁呈现蓝紫色反应的，证明有纤维素的存在。

② 木质：取天竺葵老茎做徒手切片，将切成的薄片放在载玻片上，滴上1或2滴40%的盐酸，5min后，再滴数滴5%~10%间苯三酚。肉眼观察切片由桃红色变为紫色时，加水，盖上盖玻片，放在低倍镜下观察，具有木质的细胞壁被染成桃红色。

③ 栓质：取马铃薯块茎，用带有皮的块茎做徒手切片，将切片放在载玻片上，加1滴苏丹Ⅲ溶液，盖上盖玻片，放在低倍镜下观察。栓化的细胞壁遇苏丹Ⅲ溶液变黄色。

④ 角质：取橡皮树叶做徒手切片，将切片放在载玻片上，滴加苏丹Ⅲ溶液，盖上盖玻片，放在低倍镜下观察，角化的细胞壁呈红色。

（2）胞间连丝

取柿胚乳永久制片，低倍镜下观察，找到最清晰的部位，换高倍镜观察，可见多边形的柿胚乳细胞中原生质体已消失，有许多黑色的细丝分布在很厚的细胞壁上，这些细丝即为胞间连丝。

（3）纹孔

① 单纹孔：取青椒果实做平皮切，用水封片做成临时装片。首先置于低倍镜下观察，将最清晰的部分放在视野的最中央，再换高倍镜观察。可见相邻细胞的壁上有不连续的开口，这些开口即为单纹孔，它是胞间连丝的通道。

② 具缘纹孔：取松茎的纵切片，可见具缘纹孔在木材纵切面的不同形态。

（4）质壁分离现象

撕取 3~5mm^2洋葱鳞叶内表皮，水封片后放在低倍镜下观察，可以看到每个细胞的细胞质都紧贴细胞壁；将上述玻片从显微镜上取下来，用滤纸将水吸去后，加 1 滴 5%的NaCl溶液，盖上盖玻片，3min后重新观察。可见细胞质与细胞壁分离而形成一团；再将上述玻片取下，用滤纸吸取NaCl溶液后，加 1 滴蒸馏水，盖上盖玻片，放在低倍镜下观察，可见分离的质壁又逐渐恢复到原来的状态。

【思考与作业】

1. 绘图表示洋葱表皮细胞的结构，注明各部位名称。
2. 绘图表示淀粉粒的形态及结构，注明各部位名称。
3. 绘图表示叶绿体的形态及其在细胞中的分布。
4. 如何理解植物细胞是立体结构？通过实验说明问题。
5. 通过实验所用的材料及日常生活中的经验，举出质体间相互转变的例子。

实验3 植物组织

【实验目的】

1. 观察与认识各种组织的细胞形态和结构特点，理解结构与功能的统一。
2. 了解各种组织的主要类型及分布位置。
3. 掌握分生组织、保护组织、输导组织与机械组织的细胞形态及结构特征。

【实验材料】

1. 永久制片

洋葱根尖纵切片、丁香茎尖纵切片、黑藻茎尖纵切片、玉米茎居间分生组织纵切片、接骨木茎横切片、南瓜茎横切片、南瓜茎纵切片、木材离析装片、松木离析装片、甘薯块根切片、蚕豆叶下表皮装片、棉花叶横切片、黑藻茎横切片、苹果叶下表皮装片、悬铃木叶表皮装片、天竺葵叶下表皮装片、薄荷叶表皮装片、菊叶上表皮装片、蒲公英根纵切片、蒜有节乳汁管切片、松树茎横切制片、橘果皮切片、生姜切片、黄芩根横切片。

2. 新鲜材料

芹菜、梨、白菜、洋葱、马铃薯、天竺葵茎、天竺葵叶、蚕豆或黄豆叶、小麦或玉米叶。

3. 培养材料

蚕豆、黄豆、玉米、小麦。

4. 栽培植株

天竺葵植株。

【器材和试剂】

1. 器材

显微镜、烧杯、擦镜纸、玻璃棒、镊子、解剖针、载玻片、盖玻片、刀片、培养皿、吸水纸、滴管、纱布。

2. 试剂

钌红染液、40%盐酸、5%~10%间苯三酚、番红水溶液、苏丹Ⅲ、I-KI。

【实验内容与步骤】

1. 分生组织

（1）根尖分生组织

取洋葱根尖纵切片观察，根尖分生组织位于根冠的上方，是根尖纵切片上染色最深的部分。细胞近于等径，核大，细胞中充满了细胞质，细胞排列紧密。这部分细胞中可以观察到细胞有丝分裂。

（2）茎尖分生组织

取丁香茎尖纵切片观察，茎尖分生组织位于茎的最先端，可以看到生长锥即为顶端分生组织，生长锥的外围由幼叶包被。另外，注意叶原基和腋芽原基发生部位，注意与根中的结构相区别。也可用黑藻茎尖纵切片观察。

（3）居间分生组织（示范）

取玉米茎居间分生组织纵切片，观察位于节间基部的居间分生组织。绝大部分染色较浅的细胞为基本分生组织，染色很深的索状部分为原形成层束的纵列细胞，并可见原生木质部（环纹和螺纹导管）贯穿于其中。薄壁组织细胞为横向扁平状，并伴有不同程度的液泡化。

2. 薄壁组织

取天竺葵茎做徒手切片，水封片后放在低倍镜下观察，可以看到茎的中心部分的薄壁组织。根据功能可将薄壁组织分为储藏组织、储水组织、同化组织、吸收组织和通气组织。

储藏组织：主要存在于各类储藏器官中。取甘薯块根做徒手切片，可以观察到细胞内存有大量的淀粉粒。或观察甘薯块根切片。

同化组织：取蚕豆或黄豆叶做徒手切片，制成水封片，显微镜下观察，可见位于上下表皮之间的同化组织——栅栏组织和海绵组织。或观察棉花叶横切片。

通气组织：取黑藻茎横切片观察薄壁组织之间有大小不等的空腔即为通气组织。

3. 保护组织

（1）初生保护组织——表皮、气孔及其附属物

撕取天竺葵叶表皮，水封片后在低倍镜下观察，可以看到表皮细胞的表面观。表皮细胞是由细胞壁、细胞核、细胞质和液泡组成。其中，细胞壁是波浪式，细胞间以镶嵌的方式连接在一起。换高倍镜观察，可以看到气孔是由两个肾形的保卫细胞组成，保卫细胞中有细胞核和许多叶绿体。还可以看到腺毛和先端尖的表皮毛。表皮的这些结构和它的生理功能是相一致的。也可用蚕豆下表皮永久制片观察。

取苹果叶下表皮装片（示表皮毛）、悬铃木叶表皮装片（示分枝星状毛）、天竺葵叶

下表皮装片（示腺毛）、薄荷叶表皮装片（示腺鳞）、菊叶叶上表皮装片（示毛茸），观察叶表皮上的附属物。

（2）次生保护组织——周皮及皮孔

取接骨木茎横切片，在低倍镜下可以看到最外面染成褐色的几层细胞，即为周皮。然后，换成高倍镜，可见周皮由三部分组成：最外面有数层染色较浅，没有细胞核和细胞质且细胞壁发生栓化的死细胞叫木栓层；木栓层以内有 1 或 2 层生活的细胞，细胞长轴沿圆周的方向排列，该层叫木栓形成层；木栓形成层以内有 2 或 3 层较大的，生活的薄壁细胞叫栓内层。在周皮上还可以看到有些地方木栓形成层外不形成木栓，而是形成许多薄壁细胞并留下一个孔，叫皮孔。

4. 机械组织

（1）厚角组织

取芹菜叶柄做徒手切片，钌红染色，封片后可以观察到叶柄有棱角的地方，其表皮细胞下方有成群排列的细胞。这些细胞为多角形，钌红将相邻细胞的胞间层染成红色，在 3 或 4 个相邻细胞角隅的接合处，形成一个三角形或四边形的厚壁。

（2）厚壁组织

纤维：取木材离析装片，观察纤维的形态。

石细胞：取梨果实靠近梨核部分的石细胞团，放在载玻片上，用镊子柄将其压散，水封片后在低倍镜下观察。可以看到具厚壁与空的细胞腔的石细胞。若加 1 滴 40%盐酸处理上述切片，5min 后，再加间苯三酚数滴，盖上盖玻片后观察，可以看到厚厚的细胞壁上分布的纹孔道。

5. 输导组织

（1）导管

取长度 2~3mm 白菜叶柄中的“筋”（维管束），置于载玻片上，用镊子柄将其压散，然后加 1 或 2 滴 40%盐酸，5min 后，再加间苯三酚数滴，盖上盖玻片后置于低倍镜下观察，可以看到有许多被染成红色的管状结构即为导管。

也可用南瓜茎纵切片观察导管的类型。用南瓜茎横切片也可观察到导管，可见染成红色的部分，这部分细胞管腔大、壁较厚，即为导管。

（2）管胞

取松木离析装片观察管胞。

（3）筛管

取南瓜茎的纵切片，首先在低倍镜下观察，南瓜茎的维管束类型是双韧维管束，因此，在低倍镜下找到导管后，在导管的内外两侧染成绿色的部分且较导管细的管状结构即为筛管。相邻两个筛管的横壁是筛板，筛板上有筛孔。

用南瓜茎横切片也可观察到筛管，在上述导管的内外两侧有染成绿色的部分，它是由一些大小不等的细胞组成。其中，细胞腔较大，呈多角形或圆形的就是筛管的横切面。有些筛管的横切面上可以看到筛管的筛板。换成高倍镜观察染色较深的筛板，可以看到有若干个小孔即为筛孔，位于其旁边的小的方形的染色较深的细胞为伴胞。

6. 分泌结构

用柑橘果皮做徒手切片，水封片后可以看到分泌囊，柑橘的分泌囊是溶生的，囊内

充满的物质是挥发性油，或观察橘果皮切片（示分泌腔）。松茎横切片上可以看到分泌道（树脂道），它是裂生的。取蒲公英根纵切片观察无节乳汁管、蒜有节乳汁管切片观察有节乳汁管、生姜切片观察分泌细胞及乳汁管。

【思考与作业】

1. 绘图表示天竺葵叶上表皮的表面观，注明各部位名称。
2. 绘几个芹菜叶柄的厚角组织细胞，表示其特征。
3. 绘图表示筛管与伴胞在横切面中的关系。
4. 表皮与周皮的细胞在形态结构及生理功能上有哪些异同?
5. 试举一种组织说明细胞的形态和结构是如何与生理功能相适应的。
6. 比较各种组织在形态、结构与生理功能方面的异同，并将结果填入表 3-1 中。

表 3-1　各种组织在形态、结构与生理功能上的比较

组织名称	细胞形态	细胞有无生命	细胞壁的特点	主要的生理功能	在植物体中的分布位置

实验 4　种子和幼苗

【实验目的】

1. 通过对不同类型种子的解剖观察，了解种子的基本形态、结构与类型。
2. 学会用简单的显微化学方法鉴定种子内的储藏物质。
3. 了解种子萌发形成幼苗过程中主要器官的发育过程。

【实验材料】

1. 永久制片

玉米籽粒切片、蓖麻种子纵切片、油松种子纵切片。

2. 新鲜材料

蚕豆种子、玉米籽粒、蓖麻种子、油松种子。

3. 幼苗

蚕豆、黄豆、玉米及小麦幼苗。

【器材和试剂】

1. 器材

显微镜、擦镜纸、载玻片、盖玻片、镊子、刀片、培养皿、吸水纸、纱布、滴管。

2. 试剂

蒸馏水、间苯三酚、番红水溶液。

【实验内容与步骤】

1. 种子的形态和结构

（1）双子叶植物有胚乳种子的形态与结构

取一粒蓖麻种子，观察其外部形态：种子椭圆形，坚硬的种皮上有许多花纹。种子的一端有一个海绵状结构叫种阜，能够吸水，种孔被种阜遮盖。种阜上有一个小突起叫种脐。由种脐向种子的上端纵向有一条隆起叫种脊。

剥去坚硬的外种皮，其内还有一层白色膜质的内种皮。用刀沿种脊将蓖麻种子纵切为二，可以看到种子内有大量的胚乳，胚位于胚乳的中间，靠近种阜的一端为胚根。在胚芽的两侧，能够看到紧贴胚乳的两片很薄的子叶。

再取一粒蓖麻种子，剥去种皮，沿与子叶表面平行的方向纵切，可以看到两片完整的子叶平铺在胚乳上，上面有明显的脉纹。也可取蓖麻种子纵切片观察。

（2）双子叶植物无胚乳种子的形态与结构

取浸泡 1~2 天的蚕豆种子，观察其外部形态：蚕豆种子为宽椭圆形，革质的种皮上有一条黑色的眉条即为种脐，它是种子脱离果皮时留下的痕迹。种脐的一端有种孔，吸水后种子变软，用手轻轻挤压便可从种孔处挤出水来，它是种子萌发时胚根突破种皮的地方。在种脐的另一端，有一条纵脊，即为种脊。剥去种皮即为胚，由胚根、胚芽、胚轴和子叶组成。两个豆瓣即为子叶，着生在胚轴上。蚕豆发芽时胚根首先突出种孔。

（3）单子叶植物有胚乳“种子”的形态结构

取一粒浸泡好的玉米颖果，观察其外部形态：玉米籽粒黄色近于三角形，下端有果柄。然后用刀沿与玉米种子宽面相垂直的方向纵切为两半，用放大镜观察，可以看到种子的最外层是愈合的种皮与果皮，果皮内的大部分是胚乳，胚偏居一侧。加 1 滴稀释的碘化钾溶液于剖面，可以看到整个胚乳呈蓝色，胚呈现黄色，并可以观察到胚根、胚芽、胚轴、子叶（盾片）以及套在胚根和胚芽外面的胚根鞘与胚芽鞘。

再取一粒浸泡好的玉米籽粒，做徒手切片（与上述纵切方向相同），放在低倍镜下观察。最外面是死去的厚壁组织与大多数被挤压变形的薄壁组织组成的果皮及种皮，紧贴其内侧的部分为糊粉层，细胞较大且充满糊粉粒。再往里为胚乳，它占据整个切片的大部分，偏于一侧的是胚。也可取玉米籽粒切片观察。

（4）裸子植物

取一粒油松种子观察其外形：种子卵椭圆形，棕黑色，具膜质翅，外种皮坚硬。剥去外种皮，可以看到膜质的内种皮。将种子纵剖为二，用放大镜观察，外面是厚厚的胚乳，胚乳里面为胚，胚由胚芽、胚根、胚轴和子叶组成，松树的子叶多数。也可取油松种子纵切片观察。

2. 种子内储藏物质的显微鉴定

（1）淀粉的鉴定

用浸泡 1~2 天的玉米种子做徒手切片，取具有胚乳细胞的最薄的一片，置于载玻片上，滴 1 滴碘–碘化钾溶液，盖上盖玻片，放在低倍镜下观察。由于淀粉与碘呈现蓝色反应，因此，可以看到细胞中有很多的蓝色颗粒即为淀粉粒。

（2）蛋白质的鉴定

贮藏蛋白质常以糊粉粒的形式存在于植物细胞中。取蓖麻种子，剥去坚硬的种皮，

做徒手切片，切取胚乳的部分放在载玻片上。为了将胚乳中的脂肪除去，先滴几滴 95% 的酒精，稍候，再滴 1 滴碘-碘化钾溶液，封片后，在低倍镜下观察。可以看到在薄壁细胞中布满被染成黄色颗粒的大型的糊粉粒。换高倍镜观察一个糊粉粒的结构为：外面为一层蛋白质膜，内包被染成黄色的、一至几个多边形的拟晶体为蛋白质成分。没有被染色的球晶体为非蛋白质成分。

（3）脂肪的鉴定

取一粒向日葵种子做徒手切片（切片时不用水），将切下的薄片放在载玻片上，加 1 滴苏丹Ⅲ酒精溶液染色（可在酒精灯上微加热，以促进染色），0.5~1h 后，用 50% 乙醇洗去浮色，再用 10% 的甘油封片，放在低倍镜下观察。可以看到细胞内球形的、被染成橙红色的油滴。

3. 幼苗的形成过程

种子萌发需要适宜的温度，充足的水分及足够的氧气，但是，不同的植物其萌发条件不同。可以根据当时的条件布置实验。

选择蚕豆（双子叶植物）与玉米（单子叶植物）种子观察其萌发及幼苗生长过程。种子经吸胀后，播在花盆中，等待出苗。仔细观察并记录幼苗出土情况以及形态的变化过程。

【思考与作业】

1. 绘图表示蚕豆种子的结构，注明各部位名称。
2. 绘图表示玉米种子的结构，注明各部位名称。
3. 根据实验观察，试比较单、双子叶植物的种子与裸子植物种子在结构上的异同。
4. 通过上述实验，你怎样理解“胚是一个幼小的植物体”？
5. 怎样理解子叶出土幼苗和子叶留土幼苗？

实验 5　根的形态与结构

【实验目的】

1. 了解根的基本形态和根系类型。
2. 掌握根尖的结构及其分区的特征。
3. 掌握单、双子叶植物根的初生结构的基本特点。
4. 掌握双子叶植物根的次生生长与次生结构。
5. 了解侧根的发生部位及过程。

【实验材料】

1. 永久制片

洋葱根尖纵切片、蚕豆幼根及老根横切片、蚕豆根纵切片、桑根横切片、水稻根横切片、玉米根横切片、玉米支柱根横切片、萝卜根横切片、胡萝卜根横切片、黄连根横切片、板蓝根横切片、花生根瘤切片、小麦内生菌根切片、松外生菌根横切片。

2. 培养材料

蚕豆、向日葵、小麦、玉米幼苗。

【器材和试剂】

1. 器材

显微镜、擦镜纸、载玻片、盖玻片、镊子、刀片、培养皿、吸水纸、纱布、滴管。

2. 试剂

蒸馏水、间苯三酚、番红水溶液。

【实验内容与步骤】

1. 根的形态

观察双子叶植物蚕豆、向日葵及单子叶植物玉米与小麦的根系。它们各属于什么类型的根系？有没有主、侧根？有没有不定根？侧根上是否有分枝？

2. 根尖的结构

取洋葱根尖纵切片，置于低倍镜下，可以看到根尖明显分为四个部分。

（1）根冠

位于根尖端的一团薄壁细胞，呈帽状覆盖着生长点，细胞排列不整齐，根冠的外侧细胞由于与土壤接触而破损。

（2）分生区

位于根冠内方，染色较深。换高倍镜观察，细胞较小，细胞质浓厚，细胞核大，核内进行着细胞的有丝分裂，可以看到细胞分裂的各个时期。

（3）伸长区

位于分生区的后方，较生长点颜色浅。换高倍镜观察，可以看到细胞分裂逐渐停止，细胞明显的伸长，长宽比很大，细胞中出现液泡。

（4）成熟区

位于伸长区的后方。外观上可看到有很多根毛，它是表皮细胞外壁向外突起后形成的。该区的细胞已全部成熟，并可以观察到根全部的初生构造。

3. 根的初生结构

（1）双子叶草本植物根的初生结构

取蚕豆幼根横切片，先在低倍镜下区分出幼根结构的轮廓，然后换用高倍镜由外向里进行观察。

① 表皮：最外面的一层细胞，排列较整齐，制片中表皮有无根毛？根毛与表皮细胞的关系是怎样的？是不是同一个细胞？表皮细胞之间有无气孔器？表皮细胞的细胞壁是否角质化，有无角质层？

② 皮层：表皮内方的数层薄壁组织细胞，在幼根横切面上占较大的比例，细胞较大，排列疏松，有细胞间隙。皮层的最外一层细胞为外皮层，制片不明显，皮层的最内一层为内皮层，细胞排列比较整齐，在细胞横壁与径向壁上可看到有增厚的凯氏带（不明显）。内、外皮层间是皮层的薄壁组织，占的比例较大。

③ 维管柱（中柱）：为内皮层以里所有的部分，细胞一般较小而密集，由中柱鞘、初生木质部、初生韧皮部与薄壁组织细胞组成。

中柱鞘：紧靠内皮层，除对着初生木质部的地方有二、三层细胞外，一般只有一层细胞，细胞排列整齐紧密，是根初生构造中最活跃的组织层。

初生木质部：在制片中被染成红色的部分是初生木质部，共有4~5束，排列得像四角星或五角星。换用高倍镜观察初生木质部，可看到大小不等的导管，在星芒状棱角处的导管，直径比较小，是最早形成的导管，称原生木质部；靠内侧的部分形成得较晚，导管腔较大，称后生木质部，这说明初生木质部是由外向内发育成熟的（外始式）。

初生韧皮部：在两个初生木质部辐射棱角之间，被染成绿色的一群小型细胞是初生韧皮部，蚕豆根制片中易区分筛管与伴胞。

薄壁组织细胞：在初生木质部与初生韧皮部之间有1~2层薄壁组织细胞，当次生生长开始时，转变为形成层的一部分，近横切面中心的薄壁组织细胞为髓。

桑根的初生构造：桑根的初生构造与蚕豆基本相同，但是，可以明显地观察到内皮层部分的凯氏带。

（2）单子叶植物根的结构

玉米根的初生构造：取玉米根横切片，在低倍镜下观察其全貌，从外到内可以明显地区分出表皮、皮层与维管柱，然后再在高倍镜下仔细观察各个部分。

① 表皮：表皮细胞一层，偶尔可以看到根毛。

② 皮层：皮层较宽，靠近表皮的一、二层细胞排列紧密，无细胞间隙，细胞壁增厚。称为外皮层。皮层最内一层细胞的两径向壁、上下横壁与内切向壁都增厚并栓质化，横切面上呈马蹄形——凯氏带。正对初生木质部没有加厚的内皮层薄壁细胞为通道细胞。取玉米支柱根横切片可明显观察到凯氏带。

③ 维管柱（中柱）：内皮层以里的部分为维管柱。维管柱的最外一圈排列整齐的薄壁组织细胞是中柱鞘，中柱鞘以内成圈排列着数束至十余束的维管束，靠近中柱鞘的木质部导管直径小，是原生木质部；近髓处的导管直径较大，是后生木质部。韧皮部在两束初生木质部之间，与木质部相间排列，由5~6个细胞组成，细胞直径较大的是筛管，直径较小的为伴胞。

取玉米根新鲜材料做徒手切片，将切片置于载玻片上，加40%盐酸，5min后，吸去盐酸，加入间苯三酚，封片后在显微镜下观察，可以看到导管被染成红色。另做一封片，加碘-碘化钾放在显微镜下观察，可以看到淀粉粒的存在。

水稻根初生构造：取水稻根横切片进行观察。其根的初生构造与玉米基本相同，所不同的是水稻根的皮层胞间隙扩大成气腔、气道，这种构造与水稻生长的水生环境是相适应的。

4. 双子叶植物根的次生结构

取蚕豆老根横切片（示形成层发生），在低倍镜下观察，注意表皮、皮层部分有无发生变化？重点观察中柱鞘以内各部分的变化。首先在维管柱内区分出4~5束星芒状的初生木质部，然后找出由初生木质部与初生韧皮部之间的薄壁细胞先后分裂产生的形成层，其细胞扁长形，刚产生的形成层是片段的；后来这一段形成层继续伸展与初生木质部顶端相对的中柱鞘细胞恢复分裂能力而产生的一部分形成层细胞相连接，此时整个形成层就连接了一个弯曲的环带，继而形成层逐渐成为圆环（注意本制片中尚未到此阶段，材料较幼嫩）。形成层活动后产生的衍生细胞向内分化为次生木质部，次生木质部导管较大，分布在初生木质部外侧。形成层活动后产生的衍生细胞向外分化成次生韧皮部。对着初生木质部束，还能看到数列向外射出的薄壁组织细胞即为射线。射线也是形成层细胞分裂产生的。

5. 侧根的发生

取蚕豆或玉米根横切片进行观察，可以看到对着初生木质部处的中柱鞘细胞进行细胞分裂而形成侧根的生长点，由生长点逐渐形成根的各部分，最后穿过皮层与表皮成为侧根，注意侧根的行数与木质部束数的关系。

6. 根瘤及菌根

（1）观察豆科植物具根瘤的浸制标本，可观察到根部的瘤状突起即为根瘤。

（2）取花生根瘤切片区分根的本体与根瘤部分。在高倍镜下可以观察到根瘤的本体：外围为栓化细胞，其内为薄壁细胞，中央染色较深的地方为含菌组织，根瘤菌分布在这些细胞的细胞质中。

（3）取小麦内生菌根切片，可以观察到皮层细胞中有许多真菌的丝状体，真菌与皮层细胞组成共生体，称为内生菌根。

（4）松外生菌根横切片。

7. 根的变态

（1）萝卜：萝卜横切面主要部分为次生木质部，内含大量的薄壁细胞。其外围的次生韧皮部所占比例很小，形成层位于两者之间。萝卜的肉质直根中除了一般的形成层外，还存在有额外形成层（由木质部薄壁细胞中的某些细胞恢复分裂能力形成）。

（2）胡萝卜：中心部位颜色较深、占较小比例的为次生木质部，主要为薄壁细胞，导管分化较少，成为“芯”的部分；其外围占较大比例的为次生韧皮部，是胡萝卜的主要部分。

8. 药用植物根及根茎类的构造

（1）板蓝根：从外到内依次分为木栓层、皮层、韧皮部、形成层和木质部。木栓层细胞数层；皮层很薄，有些细胞内含树脂及草酸钙针晶；韧皮部较窄，同样含有树脂及针晶；形成层环状；木质部占整个次生构造的绝大部分，木纤维呈束状，导管中有黄色的侵填体，薄壁细胞中含淀粉，木射线 2~9 排细胞宽。

（2）黄连根：由木栓层、皮层、维管束、髓组成。木栓层数层细胞；皮层所占比例较大，内含石细胞；中柱鞘纤维成束，或伴有石细胞；维管束多个，外韧类型，束中形成层明显而束间形成层不明显；髓部由薄壁细胞组成。

【思考与作业】

1. 绘蚕豆根初生结构轮廓图及 1/4 详图表示根的初生结构。
2. 绘同种植物 1/4 详图表示根的次生结构。
3. 植物的根是怎样由生长点逐渐发育成初生结构与次生结构的？
4. 单、双子叶植物的根有什么异同？
5. 双子叶植物根的初生结构与次生结构有什么区别？

实验 6 茎的形态与结构

【实验目的】

1. 了解茎的基本形态。
2. 掌握双子叶植物草质茎与木本茎的解剖结构及不同点。

3. 掌握单子叶植物茎的解剖结构特点及与双子叶植物的异同。

4. 掌握双子叶植物茎的次生结构。

5. 了解裸子植物茎的结构特点。

【实验材料】

1. 永久制片

玉米茎尖纵切片、黄杨茎尖纵切片、向日葵幼茎横切片、向日葵老茎横切片、玉米茎横切片、椴树茎横切片、松茎三向切片、洋槐维管形成层装片、木通茎横切片、络石藤茎横切片。

2. 新鲜材料

杨树、柳树、丁香枝条。

3. 培养材料

玉米、蚕豆、黄豆、小麦幼苗。

【器材和试剂】

1. 器材

显微镜、擦镜纸、载玻片、盖玻片、镊子、刀片、培养皿、吸水纸、纱布、滴管、切片机。

2. 试剂

蒸馏水、间苯三酚、番红水溶液、I-KI 溶液。

【实验内容与步骤】

1. 茎的形态

（1）枝条与长、短枝

用肉眼观察白杨枝条，先分出节与节间，有的枝条上茎的伸长生长快，节间较长称长枝；有的枝条上茎的伸长生长弱，节间极短，称短枝。叶与茎之间所成的角度称为叶腋。注意观察叶痕里面的维管束痕。

再由枝顶端向枝基部观察，在枝的顶端有顶芽，在新开放的枝条与灰褐色的较老枝条交界处有数圈密集环纹为芽鳞痕。根据芽鳞痕的数目能够判断枝条的年龄。试计算一下你所看的枝条已生长了几年？枝条每年增加的长度是否相等？再用放大镜观察枝条灰褐色光滑的外皮，这是木栓，其上椭圆形呈褐色的小点是皮孔。

再找一短枝观察上述部分的特点，并与白菜幼茎的节间发育进行比较。白菜的叶在茎基部丛生，叶子好像从根上长出来一样，实际上是其节间极短，难以辨认，这就是另一种类型的短枝。

（2）芽及其类型与结构

观察山桃、白杨、紫藤、紫穗槐、落地生根、天竺葵等植物的芽，根据着生的位置，能否区别出顶芽与侧芽？山桃的芽通常三个并生，中间一个是主芽，两旁的芽叫副芽（是花芽）；紫穗槐的腋芽上、下排列，上面的芽是副芽，下面的芽是主芽；落地生根在叶缘上着生的芽叫不定芽，它着地后能长成一株小植物。

根据芽外面是否包有芽鳞，区分哪种植物具有鳞芽？哪种植物具有裸芽？

在一种植物的枝条上常具有大小、形状不同的芽，一般大而圆的是花芽，稍小而瘦

的是叶芽，将山桃、白杨、紫藤等植物枝条上的芽纵切，用镊子轻轻剥去芽鳞，放在放大镜下观察芽的结构，根据观察的结果，判断哪种植物具有花芽、叶芽或混合芽？在靠近枝条基部，有些芽不开放，叫什么芽？什么情况下才开放？

茎上有芽，它是未展开的枝条、花或花序。取任意一个叶芽作纵切，放在实体显微镜下观察，可以观察到下列结构：生长点、叶原基、腋芽原基、幼叶和芽轴。

（3）茎的分枝

观察白杨、柳、榆、丁香等的枝条，试根据分枝的特征判断其中哪种植物是合轴分枝，哪种是单轴分枝？哪种植物是假二叉分枝？分枝与整个植株生长的形态及树冠形态有何关系？

再观察禾本科植物（小麦）的分蘖（分蘖是禾本科植物分枝方式的特殊名称），在小麦茎的基部靠近地面或埋在土壤中的几个节膨大，向上能产生腋芽，向下产生不定根，这种分枝称分蘖。产生分蘖的地方就叫分蘖节，分蘖的发生是有一定顺序的，你所观察的植株的分蘖情况如何？具有几级分蘖？

（4）茎的生长习性

观察向日葵、扁豆、藜、芦苇、牵牛、紫藤、葡萄、南瓜、爬山虎等植物的茎，根据茎生长习性的不同，你认为上述植物中哪些是直立茎？哪些是缠绕茎？哪些表现为攀缘茎？哪些为匍匐茎？此外，在实验过程中，还应注意各种植物茎的外形，如圆柱形、四棱形、三角形等。

2. 茎的解剖结构

（1）茎尖的结构

取黄杨茎尖纵切片与玉米茎尖纵切片置于低倍镜下观察。

① 分生区：茎尖的顶端有生长锥，生长锥由小的立方形细胞组成，这些细胞能不断进行分裂，产生许多新细胞，形成一个圆锥体，在圆锥体的四周形成几个小突起，每个小突起将来发育成一片叶子，所以称它为叶原基。在稍长大的叶原基的腋部，还形成一个小突起，将来会发育成一个枝芽，因此称其为腋芽原基。注意观察你的切片中有的叶原基已发育成幼叶，腋芽原基已发育成小芽，茎尖生长点后方也分化为伸长区与成熟区。但因标本制片取材的关系，伸长区及成熟区观察可能不清楚。

② 伸长区：位于生长锥的下方，是茎进行伸长生长的主要部位。在该区，初生分生组织开始形成初生组织（原表皮⟶表皮，基本分生组织⟶皮层与髓，原形成层⟶维管束）。

③ 成熟区：细胞生长已经停止，形成各种成熟组织，组成茎的初生结构。

（2）双子叶草本植物茎的解剖结构

① 初生结构：取向日葵幼茎横切片，在低倍镜下观察其全貌，大体上可以分为：表皮、皮层与维管柱，然后换用高倍镜由外向内仔细观察。

表皮：最外侧的一层细胞，细胞排列紧密，外壁可见角质层，属于初生保护组织；同时，可以观察到气孔和单细胞或多细胞的表皮毛。注意表皮细胞的形状，有无表皮附属物，有无角质层等特点。

皮层：表皮以里维管柱以外的所有部分。在茎的初生结构里所占的比例较小。靠表皮的皮层由数层厚角组织细胞组成，其内为数层薄壁组织细胞，皮层最里面的一层细胞

含有淀粉粒（制片中材料因经处理淀粉粒不清楚），故称为淀粉鞘（可参考新鲜材料的示范）。

维管柱：淀粉鞘以内的所有部分，包括维管束、髓与髓射线。

维管束：在横切面上，维管柱内方有成环状排列的维管束，维管束的大小不等，是复合组织。每个维管束都是由初生木质部、初生韧皮部及束中形成层组成，既是外韧维管束又是无限维管束。

初生木质部：由原生木质部与后生木质部组成。根据导管的直径、发生的早晚、染色的深浅可判断其发育成熟顺序为内始式。

束中形成层：是原形成层保留下来的，具有分裂能力的分生组织，在横切面上，位于初生木质部与初生韧皮部之间 1~3 层染色较浅的、扁平的细胞。

初生韧皮部：由原生韧皮部与后生韧皮部组成，其发育成熟顺序为外始式。在维管束的最外方（靠近皮层处），被染成红色的一团为韧皮纤维。

髓：位于茎的中央，由排列疏松的，常具贮藏功能的薄壁组织组成。

髓射线：位于相邻的两个维管束之间，内与髓相连，外与皮层相连，为薄壁组织，担任皮层与髓之间的物质运输，同时又兼有贮藏功能。

② 次生结构：取向日葵老茎横切片，先在低倍镜下观察其全貌，注意比较它与幼茎的不同之处，特别注意维管组织的不同及形成的变化。

表皮：向日葵老茎仍保持有表皮层，但表皮细胞已被内部的组织胀破而不具保护作用。

皮层：位于表皮以里，由薄壁组织与厚角组织组成，厚角组织靠近表皮，薄壁组织位于厚角组织内侧。

由于初生结构中维管束的束中形成层的活动使得位于两个维管束之间的薄壁细胞也恢复分裂能力形成束间形成层，两者共同组成形成层环，该形成层环向内外分别分裂分化形成次生木质部与次生韧皮部的各种细胞。

向日葵茎的中心，一直存有髓，且占较大的比例。

（3）双子叶木本植物茎的解剖结构（次生结构）

椴树茎的解剖结构。取三年生椴树茎横切片，在低倍镜下由内向外进行观察，区分出下面几部分。

① 髓：在茎中心，多为薄壁组织细胞，也有厚壁细胞，占茎横切面的很少部分，有些细胞里含有黏液，所以染色较深；有些细胞里含有结晶体。髓的周围有一些由厚壁细胞组成的染色较深的小型细胞为环髓带。

② 木质部：在髓的周围，在横切面上占有最大的比例，主要是次生木质部。由于细胞的形成顺序、细胞腔直径的大小及细胞壁的厚薄不同，可以看出明显的界限。紧靠髓的周围，初生木质部有数束，你能看清束的界限吗？与次生木质部相比较占很小的比例，其细胞腔直径较小，初生木质部外方为次生木质部，它由导管（胞腔较大）、管胞（胞腔较小）、纤维细胞（胞腔更小）及薄壁组织细胞组成。此外还有呈放射排列的薄壁组织细胞——木射线。由于细胞腔大小、细胞壁薄厚以及形成时间的不同，可以分出早材与晚材。与草质茎的结构比较，在木质部结构上有什么不同？

③ 形成层：在木质部的外侧，是由 1~3 层扁长形的排列整齐的细胞组成。也可用洋

槐茎横切观察维管形成层。

④ 韧皮部：在形成层的外侧细胞排列成梯形（底边靠近形成层），韧皮部里容易看到的是纤维（在切片中被染成红色），与纤维间隔排列的有筛管、伴胞及薄壁组织细胞（在切片中被染成绿色）。此外，与韧皮部相间分布的还有髓射线，略成梯形（底边朝向皮层）。

⑤ 皮层：在维管柱外侧，由薄壁组织细胞组成，有些细胞里含晶体，皮层最外的1~3层细胞为厚角组织细胞。

⑥ 周皮：在皮层外侧，有数层细胞：木栓层、木栓形成层及栓内层。并可以看到其上的皮孔。

⑦ 表皮：虽然周皮已产生但表皮还未完全脱落。

（4）单子叶植物茎（禾本科植物茎）的解剖结构

单子叶植物茎一般没有形成层，只有初生结构，结构也比较简单。取玉米茎横切片，在低倍镜下由外向中心进行全貌观察。

① 表皮：最外面的一层细胞是表皮组织，表皮外面有一层发亮的角质层，表皮细胞之间有气孔。

② 基本组织：在表皮下面有几层厚壁细胞叫做外皮层，是基本组织的一部分，起支持作用。外皮层以内为基本组织，其中分散着许多维管束。

③ 维管束：分散在基本组织之中，靠近茎外方的维管束较小而数量多，茎中央部分的维管束较大而数量少，玉米茎没有皮层与髓的界限。观察清楚全貌后，选取一个比较典型而又清楚的维管束，换高倍镜仔细观察，先找出木质部与韧皮部的位置，木质部朝向茎的中央，韧皮部朝向茎的外围，属于外韧维管束的类型。原生木质部是由直径较小的导管组成，在导管附近还有一个由薄壁细胞破裂形成的腔室；后生木质部是由两个较大的导管以及在两个导管之间的管胞同木质化的薄壁组织细胞组成；在韧皮部中原生韧皮部已破坏，而后生韧皮部的筛管及伴胞则较清楚；在每一维管束外面有由几层厚壁组织细胞组成的维管束鞘，它们有保护输导组织及支持的作用。在木质部与韧皮部之间没有形成层，所以不产生次生结构。

（5）裸子植物茎的结构

裸子植物茎的结构与双子叶植物茎基本相似，只是组成木质部及韧皮部的组成较为简单，主要观察裸子植物茎的次生结构。

① 树干标本的观察：取松木三个切面的标本观察，先辨认清楚横切面、径向切面与切向切面。

横切面：在横切面标本上区分出树皮、木质部及韧皮部的界限，并区分出边材与心材，年轮以及射线，所观察的树干生长了几年？

径向切面：注意观察年轮界的排列方向，心材与边材，射线的形态及形成层的位置。

切向切面：注意观察年轮与射线的形态以及与上述两个切面有什么不同。

② 松茎三切面制片观察：取松茎三向切片，先在低倍镜下了解三切面的轮廓，然后在高倍镜下仔细观察，主要了解其次生木质部在三个不同的切面上各组织的分布及形态特点。

横切面：可以看到年轮的横切及射线的纵切，可见管胞等组织的横切面，细胞呈圆形或多角形，其壁上可见具缘纹孔的切面观。所见射线是从内侧向外侧射出的线条，细

胞长形，是射线的纵切，可以看到射线的长与宽；可以观察到早晚材管胞的不同，以及年轮界与年轮。

切向切面：可以看到年轮的纵切及射线的横切。管胞等组织都是纵切面，细胞呈长方形，也可看到具缘纹孔的切面观。所见射线为其横切面，细胞呈方形，整个射线轮廓为纺锤状。可以看到射线的高度与宽度，有时可见木射线中包埋有树脂道。

径向切面：可以看到年轮与射线的纵切，所见射线及管胞等组织都是它们的纵切面，可看到具缘纹孔的正面观。可以看到射线的高与宽；树脂道呈纵向分布。

（6）药用植物茎的解剖

① 木通茎：由木栓、皮层、韧皮部、形成层、木质部、髓射线和髓组成。木栓层由数层细胞组成；韧皮部束状，外有纤维细胞组成的帽状结构，束间可见石细胞，筛管群与韧皮薄壁细胞成层状并相间排列；具有明显的形成层；木质部所占比例很大，大导管环状排列，小导管与其相间排列形成明显的层状；次生射线较窄，而初生射线（髓射线）明显且较宽；薄壁组织中含有淀粉与结晶；髓部被挤成条状。

② 络石藤茎：由木栓层、皮层、韧皮部、形成层、木质部和髓组成。木栓层为数层细胞组成，内含红棕色物质；皮层较薄，外侧有石细胞组成的不连续的环带，石细胞内含有结晶；韧皮部外侧有束状的韧皮纤维；形成层明显并成环状分布；木质部所占比例较大，主要成分为木纤维，导管少而大、散生或 2~3 并列，木质部内侧有内生韧皮部（不连续成环状），其内侧有不连续的纤维束和纤维；髓部较小。

【思考与作业】

1. 绘向日葵幼茎横切面部分详图示初生结构。

2. 绘椴树茎横切面部分轮廓图，并注明各部分名称。

3. 双子叶草本植物茎的解剖结构是怎样的？它与根的解剖结构有什么不同？

4. 双子叶草本植物茎与木本植物茎在解剖结构上的主要差异在哪里？

5. 玉米茎（单子叶植物）的解剖结构有什么特点？它与双子叶植物茎的结构有何不同？

6. 通过对松茎三切面的观察，你怎样理解茎构造的立体形象？

实验 7　叶的形态结构及营养器官的变态

【实验目的】

1. 观察叶子的组成，认识常见植物叶的外形，掌握一般叶的形态特征及其相关的术语。

2. 掌握单双子叶植物叶及裸子植物叶的解剖结构。

3. 了解不同生境植物叶片的结构特点。

4. 观察根、茎、叶各种变态器官的形态及结构，区分同功器官与同源器官的概念。

【实验材料】

1. 永久制片

棉花叶横切片、玉米叶横切片、小麦叶横切片、眼子菜叶横切片、松针叶横切片、

夹竹桃叶横切片、玉米支柱根横切片、吊兰的气生根横切片、常春藤攀援根横切片、榕树支柱根横切片、枇杷叶横切片、番泻叶横切片。

2. 培养材料

蚕豆幼苗、玉米幼苗、小麦幼苗。

【器材和试剂】

1. 器材

显微镜、擦镜纸、载玻片、盖玻片、镊子、刀片、培养皿、吸水纸、纱布、滴管。

2. 试剂

蒸馏水、间苯三酚、番红水溶液、I-KI 溶液。

【实验内容与步骤】

1. 叶的形态结构

（1）叶的形态

观察教师指定的植物材料，根据表 7-1 所列各项进行观察，将观察结果填入表中（可参考挂图及教材有关叶的形态部分）。

表 7-1　各种植物叶片形态比较

植物名称										
单叶或复叶（何种复叶）										
叶片	形状									
	叶缘									
	叶脉									
叶柄	有或无									
托叶	有或无									
叶鞘、叶舌、叶耳	有或无									
叶序										
完全叶或不完全叶										

（2）双子叶植物叶的解剖结构

取棉花叶横切片，在低倍镜下观察，分清上、下表皮，叶肉及叶脉（叶的维管束）的位置。然后选一较清晰的地方，换用高倍镜进行观察，则可明显的看到以下各部分。

① 表皮：有上、下表皮之分，上表皮细胞呈长方形，排列紧密，细胞壁外方的发亮层就是角质层；在上表皮上有单细胞毛及簇生的表皮毛，还有棒状多细胞的腺毛。注意下表皮上有无角质层？有无表皮附属物？表皮细胞间常有中断不连续的地方为一对断面略成三角形的小细胞，就是气孔，气孔内方的间隙即为气室。

② 叶肉：有栅栏组织与海绵组织的分化。栅栏组织，位于近轴面，由一层长柱状细胞组成；海绵组织在栅栏组织之下，位于远轴面，与下表皮相接，由 1~3 层薄壁组织细胞组成。

注意栅栏组织和海绵组织的细胞在形状上、排列上以及所含叶绿体的数量上有什么不同？此外在叶肉细胞中还可以看到一些分泌细胞（在切片中染成紫红色的细胞）。

③ 叶脉（维管束）：是叶中的维管束，有主、侧、细脉之别，观察主脉的维管束，木质部与韧皮部分别位于近轴面与远轴面，有形成层存在。再找一个最小的维管束进行观察，它的结构是怎样的？为什么在叶横切面的制片中可看到一些小维管束的纵切面？

（3）单子叶植物叶的解剖结构

取玉米叶横切片先放在低倍镜下观察全貌，特别要注意分清上下表皮的位置，然后换高倍镜仔细观察。

① 表皮：上表皮同下表皮细胞的形态、大小、排列是否整齐？它与双子叶植物有什么不同？在上表皮细胞中每隔一定距离（一般在两个维管束之间）有数个较大的细胞，这是泡状细胞，它们有何作用？下表皮细胞中是否也有这种细胞？在表皮细胞之间有气孔，每个气孔的细胞除了有两个保卫细胞外，还有两个横切面上近正方形的副卫细胞。气孔的组成与双子叶植物叶有什么不同？

② 叶肉：玉米叶肉组织都是富含叶绿体的同化组织，有无栅栏组织与海绵组织之分？为什么？

③ 叶脉：为平行脉，分布于叶肉组织中，每个维管束外面都有由一层薄壁组织细胞组成的维管束鞘，内含较大的叶绿体，与外侧相邻的一圈叶肉细胞共同组成“花环”结构。 再找较大的维管束进行观察，在维管束外除了有薄壁组织细胞组成的维管束鞘外，其上下侧紧接其表皮处还有机械组织，维管束中的木质部与韧皮部各朝叶的哪一面？与棉花叶维管束的结构相同吗？

（4）碳三与碳四植物叶的形态结构

① 碳四植物叶的观察：取玉米的叶片进行徒手切片，水封片后置显微镜下观察，可见 1 圈维管束鞘其外围还紧连有 1 或 2 圈叶肉细胞，这些细胞中含有较多的叶绿体，这种同心圈的结构（花环结构）为碳四植物所具有的特征。也可用玉米叶永久制片观察。

② 碳三植物叶的观察：取小麦叶片进行徒手切片后观察，可见维管束鞘由两层细胞组成（细脉只有一层细胞），没有同心圈的结构；维管束鞘外层细胞为较大的薄壁组织细胞，含叶绿体比叶肉少；内层为几乎不含叶绿体的厚壁细胞。也可用小麦叶永久制片观察。

（5）松针叶的解剖结构

取松针叶横切片观察，可以看到如下结构。

① 表皮系统：松叶的表皮细胞壁很厚，外面还附有一层很厚的角质层，表皮内侧有几层厚壁组织细胞叫做下皮层，气孔下陷至下皮层内，每对气孔由 2 个具喙的保卫细胞及 2 个副卫细胞组成，内陷气孔形成下陷的孔下室，是一种减少叶内水分蒸腾的旱生结构。

② 叶肉：在下皮层的内侧有许多呈折叠状的薄壁组织细胞为同化组织，注意观察其内的叶绿体在细胞中的排列以及树脂道的分布，树脂道的数目与位置是鉴别种的特征之一。叶横断面最内层细胞是内皮层，在该层细胞的横壁和径向壁上有比较明显的凯式带加厚。

③ 维管组织：在针叶的中央、内皮层以内有1~2 个外韧维管束。木质部朝着近轴面，韧皮部靠近远轴面。在内皮以里维管束周围分布着许多薄壁组织细胞与管胞状细胞。

（6）不同生境叶的解剖结构

① 旱生植物叶的解剖结构：取夹竹桃叶横切片观察，可以看到以下结构。

表皮：由一层以上的表皮细胞组成形成复表皮；最外层的表皮细胞的外壁上有厚的角质层；在下表皮一侧有气孔窝，气孔窝内分布有气孔及表皮毛。

叶肉：无栅栏组织与海绵组织之分，由同化组织组成，叶肉细胞中含有许多簇晶。

叶脉：有非常明显的主脉，在主脉上可以看到双韧维管束及形成层细胞；侧脉及细脉上只能看到木质部与韧皮部的少数细胞。

② 水生植物叶的解剖结构：取眼子菜叶横切片观察，可以看到眼子菜叶表皮细胞壁薄，轻度角质化，常具叶绿体，没有气孔；叶肉组织无栅栏组织与海绵组织之分；维管组织及机械组织常不发达，但有发达的气道。

2. 营养器官的变态

（1）根的变态

观察萝卜、胡萝卜、甜菜（或紫菜头）、甘薯等植物的根，因为它们贮藏有大量养分，肥厚多汁，故称贮藏根，它们又可分为两种类型。

① 贮藏根：贮藏大量的营养物质。

A 肉质直根：先观察萝卜、胡萝卜与甜菜（或紫菜头）根的肥大的部分，其上半部生有侧根的部分是真正的根，下半部是由下胚轴形成的。

胡萝卜：解剖胡萝卜的根，用肉眼或者放大镜观察其结构，可以看出它明显的分成两个部分，外围颜色较红，这是韧皮部；中心处颜色较黄，是木质部，两部分的比例如何？由中心向外围射出的线条是什么结构？有什么作用？根中的养分主要贮存在哪些部分？

萝卜：再观察萝卜根的横切面，也明显地分成两部分。但这两部分的比例恰恰与胡萝卜的相反，萝卜的木质部特别发达，养分就贮存在木质部的薄壁组织细胞中。

甜菜（或紫菜头）：甜菜的根与上述两种植物的结构又不同，在横切面上可以看到许多的同心圆，圆的内侧深红色部分为薄壁组织细胞组成，糖分主要贮存在这里。外部浅红色为一轮维管束，维管束之间夹杂着薄壁组织，每环是由一层次生形成层所产生的组织形成。第一层的次生形成层是由中柱鞘细胞分裂而成，以后的次生形成层由韧皮薄壁细胞陆续形成，从横切面上看到的同心圈的数目就可算出次生形成层的数量。

B 块根：由侧根或不定根膨大形成，一株植株可以形成许多膨大的块根。

甘薯：在甘薯块根的发育过程中，副形成层主要是由次生木质部导管周围的木薄壁细胞恢复分裂形成，也可来自于初生木质部附近的木薄壁细胞。

② 气生根。

玉米的支柱根：是玉米茎近地表的基部发生的不定根，为变态的根，它伸入土壤起支持作用。取玉米支柱根横切片可见其基本的初生结构。

榕树的支柱根：榕树茎上产生的许多下垂的气生根，进入土壤后成为支柱根，起支持与吸收作用。取榕树支柱根横切片可见其基本的结构。

水松及红树的呼吸根：生长在海滩或沼泽的植物，由于根在淤泥中呼吸困难而使根钻出淤泥背地而生的根。

吊兰的气生根：其根生长在空气中的茎上，将其栽入土中可长成一个新的植物体。取吊兰支柱根横切片可见其基本的结构。

凌霄的攀援根：凌霄茎细长柔软，其上生有不定根用于攀援它物，该不定根叫攀援根。

（2）茎的变态

① 地下茎的变态。

根状茎：观察芦苇的地下茎，找出节间、鳞片、顶芽、腋芽和不定根，如何判断它是茎而不是根？

块茎：观察马铃薯的液浸标本，你可以看到块茎是由根状茎末端膨大而成，再取一个马铃薯用放大镜找出芽眼和其下方的弧形的鳞片痕及芽眼里的小芽，每个芽眼所在的地方即是一个节，块茎的一端芽眼较大，而且比较密集，为块茎的顶端；另一端的芽眼较稀疏，是连到根状茎的一端。

鳞茎：将洋葱鳞茎纵切，在其中央下部可以找到圆锥状的部分，称鳞茎盘。其上分布着许多肉质鳞片，鳞片相当于正常茎上的叶，鳞茎盘相当于缩短的正常茎，鳞片着生的地方是节，相邻两个鳞片之间的地方是节间，在某些鳞片腋内还有腋芽，鳞茎盘的基部有不定根。

球茎：将荸荠洗净，能看到有数个圆环为节，每环节上着生有褐色膜质鳞片，这是变态的叶，鳞片腋内有腋芽，顶端有顶芽。如何说明它是变态的茎？

② 地上茎的变态。

叶状茎：假叶树的茎变成绿色叶片状，行使叶功能，仔细观察假叶树的叶状茎具有哪些茎的特征？

枝刺（茎刺）：皂荚、山楂枝上有刺，十分坚硬，不易剥下，仔细观察枝刺与叶或叶痕的关系，你根据什么特点判断它们是变态的枝？

扁化枝（扁化茎）：观察扁竹蓼整个植物体，它由许多扁平的叶状枝组成，仔细观察可区分出节与节间，节处有芽和退化的叶。

茎卷须：观察葡萄的卷须，你根据什么特征判断它是由枝条变成卷须的？

肉质茎：仙人掌类植物的肉质茎呈球状、块状、多棱柱状等，有发达的贮水组织并可进行光合作用，这种变态茎还具有较强的营养繁殖能力。

（3）叶的变态

① 叶刺：仙人掌是一种热带植物，由于长期生长于干旱环境中，叶的形态发生了变化，你能找出哪是它的叶吗？还有洋槐、酸枣的托叶变成硬刺，小檗的叶变为刺等。

② 叶卷须：豌豆羽状复叶的顶端有分枝的卷须，是由顶端的小叶片变成的，叶卷须与茎卷须的功能相同，但它们来源不同。

③ 捕虫叶：观察液浸猪笼草标本，它是一种食虫植物，它的叶片很长，末端成为瓶状，内贮液汁，昆虫落入则溺死，被消化作为植物的养料。

④ 苞片：生于花下面的特殊的叶。

⑤ 鳞片：芽外围保护芽的鳞片；根状茎、球茎节上生有膜质的退化的叶。

⑥ 叶状柄：合欢属植物的幼苗上初生有正常的羽状复叶，后来的叶随着叶柄扩展，小叶减少，最后小叶完全消失，叶柄呈叶片状，故叫叶状柄。

【思考与作业】

1. 绘棉花叶片横切面的一部分（通过主脉）详图，示其解剖结构。

2. 试比较棉花叶、玉米叶、小麦叶、松叶、夹竹桃叶和眼子菜叶六者的解剖结构，并将观察结果填入表 7-2 中。

表 7-2 六种植物叶片解剖构造的比较

植物名称	表皮	气孔	叶肉部分	维管束
棉花叶				
玉米叶				
小麦叶				
松叶				
夹竹桃叶				
眼子菜叶				

3. 通过实验你如何理解叶子的形态结构与生理功能和环境条件的统一?

4. 通过以上实验，你根据哪些特征来判断营养器官变态的种类?

实验 8 花的形态与内部结构

【实验目的】

1. 掌握花的外部形态及各组成部分的特点。

2. 理解花序的概念，掌握各种类型花序的特点。

3. 掌握花药的发育和结构及花粉粒的形成过程。

4. 掌握子房和胚珠的结构，了解胚囊的发育过程。

【实验材料】

1. 永久制片

百合子房横切切片、百合花药横切片、花粉切片、花粉装片、花粉萌发装片。

2. 新鲜材料

百合鲜花、独行菜花序、梨或苹果花序、车前花序、葱花序、法国梧桐花序、蒲公英花序、白杨的雄花序、珍珠梅花序、胡萝卜花序、委陵菜花序、勿忘草花序、益母草花序、石竹花序。

【实验器材】

光学显微镜、解剖镜、解剖针、镊子、载玻片、盖玻片、刀片。

【实验内容与步骤】

1. 花的外部形态及组成

(1) 百合花的组成

取一朵花由外向内逐步观察其各组成部分。

花被：黄色或白色，共 6 枚，分两轮排列，每轮 3 枚。

雄蕊：位于花被内侧，共 6 个雄蕊，着生在花托，每个雄蕊由花丝和黄色的花药组成，花药较大，丁字药，内含有花粉粒。取花粉粒制成水封片可以观察到花粉粒的形态。

雌蕊：1 枚，由柱头、花柱和子房组成，花柱较长，子房上位、三棱形。

花托：花柄先端膨大的部分，是以上各部分共同着生的场所。

花柄：位于花托下面，为花与茎相连的部分，柄状结构，是每朵花着生的小枝。

（2）小麦的花序和花的组成

取一个尚未开花的小麦麦穗观察：小麦麦穗就是一个复穗状花序，许多小穗（穗状花序）以互生的方式着生在穗轴的两侧。

用镊子取下小穗解剖观察：小穗基部两片绿色瓣片状的是颖片（护颖），颖片内有2~3朵正常发育的小花。

再用镊子取发育完全的一朵小花，用放大镜观察，花基部有一片外稃，外稃尖端常延伸成芒。另有一片为内稃，外稃基部的两个小囊片就是浆片，雄蕊3枚，花中心处是雌蕊，雌蕊柱头二裂呈羽毛状。

（3）根据表8-1分析下列各花的组成及其特点

表8-1　几种植物花的组成及主要特征

植物名称	花公式	雄蕊类型	雌蕊类型	胎座类型
菜豆				
白菜				
棉花				
山桃花				
黄瓜花				
莲花				

2. 花序的组成及类型

（1）无限花序：是单轴分枝式形成的花序，花在花轴上自下往上或自外往内发育，最小的花位于花轴的顶端或中心，而最老的花则在花轴的下部或外部，无限花序有下列几种。

总状花序：观察白菜（或独行菜）的花序，着生在花轴上的花都有近等长的花柄，花自下向上逐渐幼小，并按互生次序排列。

伞房花序：观察梨或苹果花的标本，它和总状花序排列相似，只是下部的花柄其长度大大超过上部分的花柄，因此各朵花几乎处于相同的高度。

穗状花序：观察车前的花序，它与总状花序排列相同，只是花柄甚短，似无柄。

伞形花序：观察葱的花序，花轴的节间极度缩短，因此花柄好像是从一个地方长出来的，苞片很接近因而形成总苞，花柄等长。

头状花序：观察法国梧桐标本，花集中在膨大的花轴顶端，每朵花着生于短的花柄上，似无柄。

兰状花序：观察向日葵（或蒲公英）的花序，无花柄的小花着生于平坦或稍突起的花轴上，花轴下面为许多苞片，形成总苞。向日葵的整个花序上着生有两种不同类型的花：边缘是具有黄色花冠的假舌状花，雌雄蕊均不发育；其内为管状花，为两性花。

柔荑花序：观察白杨的雄花序，它是一种近似穗状的花序。但花单性，整个花序柔软下垂。

以上七种为简单的无限花序，下面继续观察由简单无限花序组成的复合无限花序

圆锥花序：观察珍珠梅花序，花序由主轴生出分枝，这些分枝又生出侧枝，每个枝是一个总状花序，主轴上顶部的分枝较短，基部的分枝较长，整个花序构成圆锥形。

复伞形花序：观察胡萝卜（或茴香）的花序，它是伞形花序的联合，每一小枝为一

个小伞形花序，在总花序下方和每个小伞形花序下方都有总苞，有的总苞不发达，这种花序是伞形的特征。

（2）有限花序

当茎成合轴分枝时则形成有限花序。这种花序着生在主轴上，顶花先开放，在第一朵花下面长出一个或数个侧枝，其中每一个侧枝顶端的顶花又先开放，这种花序即为有限花序。有下列几种。

单岐聚伞花序：由合轴分枝形成，花序主轴先生一花，顶花下的一侧形成分枝，分枝顶端又生一顶花，顶花下方又产生二级分枝，依次类推，形成合轴分枝式花序。包括两种类型。

① 螺旋状（镰刀状）聚伞花序：观察附地菜、勿忘草或萱草的花序分枝。如果各级分枝都是从轴的一侧长出。所以，整个花序呈现螺旋状、向一方弯转。

② 蝎尾状聚伞花序：观察唐菖蒲、委陵菜的花序。各级分枝是左右交互相间长出，整个花序左右对称。

二歧聚伞花序：观察石竹植株。花轴顶端着生顶花，在顶花下面有 2 个侧枝，侧枝顶端又生有顶花，此顶花下面又生有第二级侧枝，依次类推形成的花序。花的基部有苞片。

多歧聚伞花序：观察大戟和益母草的花序。顶花下同时发出 3 个以上的分枝，各分枝以同样的方式进行分枝，各分枝又自成一个小的聚伞花序。

3. 花的内部结构

（1）百合花的内部结构

百合花大，易于做徒手切片观察其内部结构。

① 将新鲜的百合花蕾纵切，观察花的纵剖面结构。

② 将新鲜的百合花蕾横切（在花药和花柱位置），观察花各部在横切面的排列位置。

③ 将花蕾在子房处横切，注意观察子房在横切面的结构。

（2）百合雌蕊的结构与发育

① 柱头：观察柱头纵切片，可以观察到柱头表面的乳突、落在柱头上的花粉，甚至可以看到已萌发的花粉管。

② 花柱：观察花柱横切制片，可见中空的花柱道及具有分泌功能的内表皮细胞。

③ 子房：取百合子房横切片，观察子房的结构。百合子房是由三心皮组成的合生雌蕊，具有三个子房室，每个子房室中着生有两个倒生的胚珠，胚珠着生于腹缝线上，胚珠着生的部位形成中轴胎座。在低倍镜下，选择一个通过倒生胚珠的正中的纵切面，换高倍镜观察：可以看到两层珠被、珠柄、珠心、合点、珠孔和胚囊等结构。

（3）百合胚珠和胚囊的发育

观察百合胚囊发育各个时期永久制片，可以看到胚囊发育经历的各时期及特点。

① 胚囊母细胞时期：胚珠原基出现，珠心处分化出胞原细胞，进而形成胚囊母细胞。

② 四分体时期：胚囊母细胞经过减数分裂形成四分体，进而形成一个大孢子核，没有伴随细胞壁的形成。

③ 胚囊发育时期：只有一个大孢子核都参与胚囊的形成，属于蓼型（即 1 孢子 8 核类型）。

④ 成熟胚囊时期：在珠孔端形成三细胞的卵器，合点端形成三个反足细胞，胚囊中央形成两个极核。

（4）百合雄蕊的结构和发育

观察不同发育时期百合花药横切制片，了解其结构和发育：百合花药幼熟期由药隔连接有四个花粉囊。花药的发育过程包括。

① 造孢组织时期：取幼嫩的百合花药横切片，在低倍镜下观察。可见一个花药分为左右两半，两半中间有药隔，在药隔处还可看到维管束，每半有两个花粉囊。花药轮廓看清后，换用高倍镜仔细观察。最外一层是表皮细胞；表皮下面是细胞壁尚未增厚的纤维层细胞（初期叫药室内壁）；在横切片上细胞近似方形，这层细胞以内有 2~3 层较扁平的细胞即中层；中层以内的一层细胞是绒毡层，细胞呈长方形。绒毡层以内为药室，每一个药室中有许多造孢细胞，细胞呈多角形；细胞中细胞质浓，核也大，有的造孢细胞已分化成为花粉母细胞。

② 单核花粉粒形成时期：取发育较晚些的百合花药横切片进行观察：表皮、纤维层和中层的细胞均无显著变化，而绒毡层的细胞已破裂或残缺不全。花粉母细胞此时已开始进行减数分裂，形成两个或四个细胞，每一个细胞就发育成一个单核时期的花粉粒。

③ 成熟花粉粒时期：取成熟百合花药横切片进行观察：此时表皮已萎缩或残缺不全，纤维层细胞壁不均匀加厚并木质化，木质化加厚部分染成红色，中间层和绒毡层细胞都已破坏并消失。两个花粉囊的隔膜也破裂，有些单核花粉已进行分裂，进一步发育成雄配子体（成熟花粉粒）。选一个完整的花粉粒在高倍镜下观察，可以看见每个花粉粒有两层壁，内壁薄，外壁厚，外壁上还有花纹，仔细观察萌发孔。有的花粉粒内可看到两个细胞，你能区分出营养细胞和生殖细胞吗？

④ 花粉粒形态观察：取成熟的白菜、豌豆等的花药各一个，分别放在载玻片上，用解剖针挑破花粉囊，使花粉散出，滴加 0.1%~0.2%蔗糖溶液后封片观察，比较不同植物花粉的形态特征。也可用不同植物花粉装片、花粉萌发装片进行观察。

⑤ 示范镜下观察花粉母细胞减数分裂各时期及特征。

【思考与作业】

1. 绘图表示百合花的外部形态。

2. 绘轮廓图表示子房、胚珠和胚囊在位置上的相互关系，注明各部分名称，并单独绘制一个胚珠的详细结构图。

3. 绘图表示百合花药（成熟时期）的解剖结构。

4. 如何证明花是变态的枝条？如何区别有限花序和无限花序？

5. 花粉粒是怎样形成的？

6. 胚囊是怎样形成的？

实验 9 胚的发育、种子与果实的形成

【实验目的】

1. 掌握双子叶植物荠菜胚及胚乳的发育过程。

2. 了解种子及果实的形成过程。

【实验材料】

1. 永久制片

荠菜幼胚，中胚，老胚纵切片，洋金花横切片，宁夏枸杞花横切片，蛇床子分果横切片，小茴香分果横切片，罂粟果实横切片，无花果实纵切片。

2. 新鲜材料

苹果、橘子、草莓、葡萄（或番茄）、菠萝、杏、黄瓜。

3. 标本

花生、大豆、牵牛、白菜、独行菜（或荠菜）、向日葵、板栗（或榛子、核桃）、玉米、榆树（或臭椿）、小茴香（或苘麻）、八角茴香、桑椹。

【实验器材】

光学显微镜、解剖镜、解剖针、镊子、载玻片、盖玻片、刀片。

【实验内容与步骤】

1. 双子叶植物荠菜胚及胚乳的发育

（1）荠菜短角果的形态结构

荠菜短角果为三角形，由两个心皮构成，形成一室，侧膜胎座。但在两个心皮相连接的腹缝线处延伸成一个隔膜，将子房分为二室，故叫假二室，此隔膜不是心皮弯向子房内形成的，所以叫假隔膜，胚珠排列成两排，并着生在两条腹缝线内。

（2）荠菜胚及胚乳的发育

取荠菜幼胚纵切片观察，子房室中有多个胚珠，低倍镜下先看清子房切面的轮廓，然后找一个切得较完整的胚珠仔细观察。

① 原胚时期：胚还没有分化出各种器官的阶段。荠菜胚珠是弯生的，此时其内珠被已消失，只留下外珠被，珠被以内有一层排列紧密的细胞，里面含有黄色的物质，那是残余的珠心组织，其内有一个马蹄形的弯生胚囊。胚囊靠近珠孔的一个大细胞叫做基细胞，其上有 7~8 个细胞组成的胚柄，胚柄顶端有由多个细胞组成的球形胚体。胚囊中心处能看到由极核受精后所形成的初生胚乳核，经过多次分裂形成游离核时期的胚乳，尚未见到胚乳细胞的形成。

② 分化胚时期：取荠菜中胚发育时期的切片观察。胚开始分化出各种器官到这些器官分化完全之前的阶段。取发育较老的荠菜子房纵切片观察，球形胚经过分化形成心形胚（两个子叶原基的突起明显可见）至鱼雷形胚（胚体和子叶进一步长大）。随后，胚随胚囊的形状发生生长弯曲变化，形成了手杖胚。胚柄逐渐退化，仅基细胞明显可见。同时，游离核时期的胚乳，其核周围开始形成细胞壁，形成胚乳细胞，胚珠内胚体已明显地区分出胚根（在近珠孔的一端）、胚轴和两片子叶。

③ 成熟胚时期：取荠菜老胚纵切片进行观察，此时整个胚囊已被胚占满，胚柄与基细胞已消失，胚乳和珠心组织已全部被胚吸收，珠被已形成种皮，胚已具有两个粗而弯曲的子叶，在两片子叶中间有一小突起是胚芽，与两片子叶相连处是胚轴，胚轴下方为胚根。胚根对着珠孔，成熟的胚珠就是一粒种子，胚乳在胚发育过程中全部被胚吸收。

2. 果实

（1）观察单果、聚合果与复果的结构

① 单果：取一个未成熟的番茄果实，先观察其外形，你能否找出果柄、花托、花萼与花冠着生的痕迹？如何判断它是一个单果？用刀片横切果实，它分为几室？每室内有多少种子？

② 聚合果：取一个草莓果实，纵剖为两半，哪一部分是花托？你能否找到花萼、花冠着生的痕迹？在其凸形花托的表面着生许多小坚果，它是由每一个雌蕊的子房发育而成的，肉质的花托和上面着生的许多小坚果合在一起，叫做聚合果，聚合果是由一朵花的花托和分离子房形成的。

③ 复果：观察凤梨（菠萝）的外形，凤梨是由一个花序发育而成的果实，它的花为不孕花，花轴肉质化为主要的食用部分。

（2）观察真果和假果的结构

① 真果：取山桃或杏果实，观察其外形。再用解剖刀纵向剖开可见其果皮分为三层。

外果皮：果实最外一层。

中果皮：肉质多汁，为人们食用部分。

内果皮：中果皮以内，木质化坚硬的部分，内果皮里面含有种子。

② 假果：取梨果进行观察，它与山桃果实有什么区别？用解剖刀纵向剖开，由外向内观察其结构，其果实由子房和花托及花筒部分组成。

观察常见植物（上课时指定）果实的结构及特征，并将观察结果分别填入表 9-1。观察时注意其外形及构造上的特征，并与相似的果实加以比较，以决定其所属类型。

表 9-1 果实的结构及特征记录表

果实类型	植物名称	主要特征
浆果		
瓠果		
柑果		
核果		
梨果		
荚果		
蓇葖果		
蒴果		
角果		
瘦果		
坚果		
颖果		
翅果		
分果		
聚合果		
复果		

【思考与作业】

1. 绘简图表示荠菜在不同发育程度时胚珠的构造（主要表示胚的构造），并注明各部分名称。注意胚在胚囊内位置上的变化。

2. 荠菜胚的发育过程是怎样的？

3. 绘大豆、山桃和梨果实的剖面图。

4. 将所观察果实的名称及特点填入表 9-1 中。



第二部分

分类篇

实验 10　藻 类 植 物

【实验目的】

1. 掌握藻类植物各门的主要特征。
2. 了解藻类植物在植物系统中的地位。
3. 学习观察低等植物的基本实验方法。

【实验材料】

蓝藻门（Cyanophyta）、绿藻门（Chlorophyta）、轮藻门（Charophyta）、金藻门（Chrysophyta）、褐藻门（Phaeophyta）、红藻门（Rhodophyta）植物的切片。

【实验器材】

显微镜。

【实验内容与步骤】

1. 蓝藻门（Cyanophyta）

（1）色球藻属（*Chroococcus*）

在示范镜下观察：植物体为单细胞或群体，单细胞时细胞球形。刚分裂者略长形或半圆形，单独存在或细胞分裂后不分离，成为少数细胞组成的群体。每个细胞外都有个体胶质鞘，胶质鞘无色或黄棕色，分层次或不分层次，群体外还有公共的胶质鞘。原生质体呈现蓝绿色。

（2）颤藻属（*Oscillatoria*）

颤藻是淡水中分布极为普遍的蓝藻，取新鲜材料做水封片观察。藻体丝状，由单列细胞组成。顶端细胞呈半圆形或其他形状，其他细胞为长方形。藻体上常会发生死细胞或胶质隔盘而将丝体分割成为数段，每一段即为一段藻殖段，整个藻体呈现蓝绿色。在显微镜下可以看到丝体左右和前后颤动。

（3）念珠藻属（*Nostoc*）

藻体常为胶质群体，呈球形、片状或发状，藻体内部是由许多弯曲的藻丝组成，每一条丝是由单列球形细胞相连而成，其中有若干体积较大，内含物变稠的细胞，这种细胞称繁殖孢。经过休眠后萌发成新的丝状体，两个异形孢之间的一段丝状体即为一段藻殖段。

异形胞壁厚，与营养细胞连接处的内壁为球状加厚，叫做节球，异形胞的内含物较均匀透明。

取浸制标本做水封片或取永久制片观察其藻体结构。

2. 绿藻门（Chlorophyta）

（1）衣藻属（*Chlamydomonas*）

衣藻是水生的能运动的单细胞绿藻。个体很小，其形态结构须在显微镜下观察：

衣藻细胞多呈卵圆形、球形或椭圆形，有 2 根鞭毛。具薄而透明的细胞壁，细胞内

有一个几乎充满整个细胞的大形厚底杯状叶绿体，杯口对着细胞的前方，在杯的底部包含一个较亮的球形小体，这个细胞器具有形成淀粉的功能，故称淀粉核。在小体前端可以看到一个红色眼点（眼点在放大光圈时看得较清楚）。细胞的其他部分：收缩泡不易见到，细胞核未经染色时也看不见，衣藻的核在细胞中央位于叶绿体凹陷处的细胞质中。

衣藻的观察可用盐藻代替，取盐藻水样做临时水封片。盐藻（*Dunaliella salina*）为盐藻科盐藻属，具有和衣藻属相似的原生质结构，但它是裸露的。盐藻大量出现在靠海岸的盐场，其大小约 25μm。在不适宜的营养条件下血红素积累，这样便掩盖了叶绿体。

（2）团藻属（*Volvox*）

取团藻的整体装片在低倍镜下观察，可见植物体彼此排列成一个空心球体。

在适宜的条件下团藻无性生殖可连续在新个体内再行繁殖。新形成的个体常常保留在母体内，在观察中可能见到三代同堂的情况。

（3）丝藻属（*Ulothrix*）

用镊子取少许材料做水封片观察，或取整体装片观察：藻体为不分枝的丝状体。在它的基部有一个特化的细胞称为固着器，它依靠固着器固着于基物上生活，固着器的叶绿体退化甚至消失，在丝藻的其他细胞内，叶绿体呈半环状，不完整地围绕在细胞内周边。

（4）石莼属（*Ulva*）

石莼是海产绿藻。观察蜡叶标本：藻体绿色，扁平呈叶片状。基部以不太明显的固着器固着于基物上。

（5）水绵属（*Spirogyra*）

水绵是极为普遍的淡水丝状绿藻，观察新鲜材料：先用手摸，试其感觉，因细胞壁有厚的胶质，故有滑溜感。

用镊子取少许材料做水封片在显微镜下观察：植物体是单列细胞组成的不分枝丝体，细胞长筒形，细胞内有螺旋环绕的带状叶绿体。每一个叶绿体内含有一列淀粉核。

取永久制片观察水绵的接合生殖。

3. 轮藻门（Charophyta）

轮藻属（*Chara*）

藻体高 10~20cm，以假根固着在水底污泥中，体表被钙质，假“茎”有节和节间的区别，节上长有轮生假叶，其上方有卵囊，下方有精囊。

4. 金藻门（Chrysophyta）

（1）圆筛藻属（*Coscinodiscus*）

圆筛藻在海洋中分布极为普遍，观察浸制标本，用滴管吸取水样做水封片观察：圆筛藻是单细胞种类，细胞形状有如一套培养皿，有两个观察面，圆的一面称为壳面。从细胞的侧面看去为扁长方形，这一面称为环面。在视野中通常见到的是它的壳面，在壳面上可见细胞壁上有排列整齐的六角形花纹。

（2）舟形藻属（*Navicula*）

舟形藻属的种类很多。细胞形状有如长形小盒，相对于盒的上下面称为壳面，侧面为环面。壳面呈纺锤形或舟形，环面为长方形，壳面上沿中线细胞壁上有一个裂隙称为脊，沿着脊在细胞中央处壁增厚，称中央节，在两极处壁增厚称极节。在脊的两侧有羽

状排列的花纹，细胞有两片褐色的色素体。在细胞质中有时看到油滴状态的贮藏物质。

用滴管吸取含有舟形藻的水样做水封片观察，根据舟形藻的特征，从许多硅藻中区别出舟形藻。新鲜的舟形藻可以运动，这是由于原生质流动，在脊处与水发生摩擦而使细胞移动。观察壳面上的花纹，需选择不含原生质体的空细胞壁观察壳面特征。

5. 褐藻门（Phaeophyta）

（1）水云属（*Ectocarpus*）

藻体为丝状体，褐色，高 5~15cm，丛生，固着在基物上（观察蜡叶标本）。

（2）海带属（*Laminaria*）

海带（*Laminaria japonica*）是我们所熟悉的食用海藻，其外观褐色，基部有双叉分枝的固着器，固着器以上为不分枝的柄部。柄上连以狭长宽而扁平的带片。

海带的内部结构较复杂，最表面是表皮，表皮由 1~2 层小而排列紧密的细胞组成，细胞内含有色素体。表皮以内为皮层，细胞较大，排列疏松。中心为髓部，髓部由许多交错的藻丝体组成。

到生殖时期，在带片表面出现一些深褐色隆起的斑块，该斑块是由成片相聚的孢子囊形成，称孢子囊群。观察浸制的有孢子囊群的海带。

观察孢子囊群切面：孢子囊呈棒形，平行排列，呈栅栏状着生在带片表面，间杂于孢子囊之间还有许多无生育能力的细长细胞，这些细胞称为隔丝。注意区别孢子囊和隔丝，孢子囊的原生质较浓，染色较深。

（3）马尾藻属（*Sargassum*）

马尾藻是我国沿海普遍分布的大型褐藻。观察浸制标本及蜡叶标本，外观颇似高等植物，有固着器，有“茎”及“叶”的分化。固着器盘状，有时为裂片状。“茎”圆柱形，有许多分枝，“叶”扁平，形状依种类而有所不同。“叶”腋外生有充满气体的空囊，称为气囊。气囊可使藻体漂浮于水中。生殖时，在“叶”腋间生出圆柱棒状或纺锤形的小枝，称生殖托，将浸制标本上的生殖托对着光线观察可见到表面有许多小点，生殖器官即着生于此部位上。

6. 红藻门（Rhodophyta）

（1）紫菜属（*Porphyra*）

紫菜是食用价值很高的海产蔬菜，观察市售商品紫菜外形。

观察蜡叶标本：藻体紫红色，膜质，叶片状，形状依种类不同而不同，边缘皱褶波状。在有的标本上，藻体边缘部分变成黄色或白色，说明该部位已发生生殖。

（2）石花菜属（*Gelidium*）

取蜡叶标本观察外形：藻体深红色或棕红色，数回羽状分枝，枝扁平，对生或互生。藻体韧性强，直立生长。

（3）江蓠属（*Gracilaria*）

江蓠（*Gracilaria confervoides*）是制作琼脂的原料，观察蜡叶标本：藻体新鲜时紫褐色，有时灰绿色，干后变黑褐色。树状分枝，枝圆柱，基部有盘状固着器，在雌性配子体表面散生许多半球状突起，是生殖时产生的囊果。

【思考与作业】

1. 绘水绵接合生殖图，并注明各部位的名称。

2. 绘衣藻细胞图，并注明各部位的名称。

3. 根据观察材料总结藻类植物各门的主要特征。

4. 试比较紫菜与江蓠的生活史有何不同？

实验 11　苔藓植物和蕨类植物

【实验目的】

1. 掌握苔纲、藓纲及角苔纲的主要区别。
2. 掌握蕨类植物门的主要特征及生活史。
3. 了解蕨类植物的主要类群及中柱类型。
4. 比较藻类植物与苔藓植物以及蕨类植物的主要差别。

【实验材料】

地钱的浸制标本、葫芦藓新鲜植物体及其切片、满江红浸制标本，以及石松、卷柏、木贼、肾蕨、铁线蕨的蜡叶标本。

【实验器材】

实体解剖镜、显微镜、放大镜、解剖针。

【实验内容与步骤】

1. 苔藓植物门（Bryophyta）

（1）苔纲（Hepaticae）

地钱（*Marchantia polymorpha*）

取浸制标本观察地钱外形：植物体为伏生地面扁平片状，二叉分枝的叶状体。腹面（即向地的一面）的毛状物是它的假根。植物体的背面（向上的一面）有雌雄生殖器官，着生在伞状物上。地钱为雌雄异体，雄配子体背面生长的伞状物称精子器托，托顶盘状边缘有浅缺刻。雌配子体的伞状物称颈卵器托，顶端盘状部有向四周生出的指状芒线。

通过模型观察精子器及颈卵器着生的位置，精子器着生在精子器托盘部上表皮面凹的腔中；颈卵器着生在颈卵器托盘的下表面每两个芒线之间。

用浸制材料观察孢芽杯，孢芽杯着生于植物体背面，呈杯状，在孢芽杯内产生孢芽，地钱利用孢芽进行营养繁殖。

（2）藓纲（Musci）

葫芦藓（*Funaria hygrometrica*）

用放大镜观察植物体配子体外形：植物体矮小有茎、叶分化。叶卵形，有中肋一条，螺旋排列于茎上。用解剖针取下一片叶片做水封片观察。叶仅由一层细胞组成，中肋部分为数层长形细胞，故可知中肋不同于一般植物的叶脉。

观察精子器切片：可见在茎的顶端有许多精子器。精子器壁由一层细胞组成，精子器内的许多小方形细胞是精子母细胞，到成熟时形成精子，精子器以柄着生于茎顶端（柄不一定能切上，须在切片上寻找）。

观察颈卵器切片：数个颈卵器着生在茎顶端。颈卵器是多细胞的雌性生殖器官，分

颈部和腹部，卵位于腹部（在有的片子上颈部未能完整切下，或在制片过程中卵已脱落）。卵受精后，合子留在颈卵器内发育，经过胚的阶段发育为孢子体。

观察具有孢子体的植株外形：在配子体上生有孢子体，孢子体具有长的蒴柄。蒴柄顶端为孢蒴（即孢子囊）。在未成熟的孢子体上，可见到蒴帽（在孢子体发育时颈卵器撑裂为上下两段，上段始终覆罩在孢子体外，随着蒴帽的延伸而高举起来，很像帽子一样罩在孢蒴之外，故称蒴帽）。已成熟的孢子体，孢蒴已膨大，并向一侧歪斜，蒴帽脱落后，可见孢蒴顶端有一圆盖，即蒴盖（用放大镜观察）。

取原丝体的片子观察：原丝体丝状有分枝，有单列细胞的假根伸入土壤中。在原丝体上生有幼小的配子体，当配子体长成后，原丝体即行死亡。配子体即为我们所见的葫芦藓的植物体。

2. 蕨类植物门（pteridophyta）

（1）石松纲（Lycopodine）

石松属（Lycopodium）

石松是酸性土壤的指示植物，在我国长江以南分布甚多，自蜡叶标本观察植物体外形，植物体具有横行地面的匍匐茎，在标本上首先找着匍匐蔓，然后沿匍匐茎观察，自匍匐茎向下生有不定根伸入土壤中，向上生直立茎，两种茎均为二叉分枝，叶细小，螺旋排列于茎上，在叶较稀疏的直立茎的顶端有圆柱形孢子叶球。

取孢子叶球纵切片观察，在中轴两侧排列有许多孢子叶，在每个孢子叶的腋间生有一个孢子囊，孢子囊内有很多孢子，无大小之分。

卷柏属（Selaginella）

观察卷柏蜡叶标本或浸制标本，植物体为二叉分枝，每分出的二支均为一长一短，叶鳞片状。分背腹面作四行排列：背面（上面）两行较小，腹面（下面）两行较大。茎基部生不定根，或自茎上生出无叶的分枝称根托，再由根托末端生出不定根。孢子叶球甚小，四棱棒状，着生于枝的顶端。取孢子叶球纵切片观察，中央有一中轴，两侧有许多孢子叶，孢子囊着生于叶腋内，有的孢子囊内只含有四个大孢子（一张切片上不能同时观察到四个大孢子），这就是大孢子囊，有的孢子囊内含有数量很多的小孢子，此为小孢子囊。

（2）木贼纲（Equisetinae）

木贼属（Equisetum）

自蜡叶标本观察植物外形：植物体有地上茎和地下茎之分。地上茎为绿色，能进行光合作用。表面不平，有凹入的槽及凸的脊条。有明显的节和节间，节上轮生极小的叶，叶基部联合成筒。节上轮生分枝。孢子叶球短圆柱形，生于茎的顶端，地下茎褐黑色，也有节与节间之分，节上生有不定根。

（3）真蕨纲（Fillicinae）

肾蕨（Nephrolepis cordifolia）

观察盆栽新鲜材料：叶自地下茎生出、丛生地面、叶狭长，一回羽状复叶，小叶无柄。长卵形或长椭圆形、基部较宽，为不对称的心脏形。观察叶的背面，可发现有些叶片的背面，中脉两侧各有一列棕色小点，每个小点便是一群相聚在一起的孢子囊，称为孢子囊群。仔细观察，还可看见在每个孢子囊群的表面覆有一个肾形的膜状物，这层膜

称为囊群盖。

从标本上观察肾蕨的地下部分：地下茎横行或斜行生长，侧枝上生有圆球形的块茎。自地下茎生根，蔓延生长在土壤内。

用解剖针从孢子囊群上挑取棕色粉末（即孢子囊），做成水封片观察，选择孢子已放出的空孢子囊，如孢子均未散出，可轻压盖片使孢子囊破裂后再观察。孢子囊扁圆透镜形，下有一柄。孢子囊壁由一层细胞组成。壁上有一列细胞组成环带，自孢子囊柄起，经孢子囊顶部而达囊的另一侧，作大半环环绕在孢子囊上。环带细胞的壁除外缘部分外，其余均为厚壁。

观察真蕨配子体的整体装片，真蕨的配子体叫做原叶体，原叶体甚小，心脏形，先用肉眼观察装片中配子体的大小形状，再置于显微镜下观察，原叶体腹面偏于后方生有许多单细胞的假根，顶端凹陷处及假根间或附近生有一些颈卵器和精子器。

铁线蕨（*Adiantum capillus-veneris*）

野生或庭园盆栽供观赏，观察盆栽的新鲜植物：根状茎埋于地下，叶柄出土，紫黑色，有光泽，如铁丝状，叶片宽，一至三回羽状复叶，叶片互生，小羽片呈扇形或斜方形，孢子囊群着主叶缘。

满江红属（*Azolla*）

观察浸制标本，植物体小形，茎细弱，羽状分枝，下侧生有许多不分枝的不定根，叶小形，互生，呈覆瓦状两行并列于茎上，叶二裂，一裂片露出水面由数层细胞组成，有气孔，且细胞间隙较大。另一裂片沉水，细胞为单层，无空腔，在露出水面裂片的叶基附近向轴面有一大室腔，里面常有与其共生的鱼腥藻。

取浸制材料在解剖镜下观察，先看清植物体各部分，再取一裂片（浮水片）用针剥开叶基部，观察鱼腥藻与其共生情况。

【思考与作业】

1. 绘图说明葫芦藓植物体的结构。
2. 比较苔藓植物门中苔纲和藓纲的主要异同。
3. 简述蕨类植物的生活史，并比较它与葫芦藓植物的生活史有何不同？
4. 比较蕨类植物三个纲的主要异同。
5. 与苔藓植物相比，蕨类植物的哪些主要特征更适于陆生生活？

实验 12　裸子植物

【实验目的】

1. 掌握裸子植物的主要特征。
2. 掌握裸子植物的主要分类依据。
3. 学会识别常见裸子植物的科、属和种。
4. 学会使用检索表。

【实验材料】

苏铁的彩色投影图片和干制孢子叶球，银杏花的浸制标本和胚珠切片，银杏、油松、

雪松、圆柏、侧柏、水杉的彩色投影图片和它们的新鲜标本或蜡叶标本。

【实验器材】

多媒体投影设备、显微镜、实体解剖镜、解剖针。

【实验内容与步骤】

1. 苏铁纲（Cycadopsida）

苏铁（*Cycas revoluta*）

观察盆栽的植株：苏铁是常绿的木本植物，树干粗壮，圆柱形、直立不分枝，顶端生一丛羽状复叶。苏铁的小叶片坚硬，革质且有光泽，幼时回旋状卷曲，很像蕨类的幼叶。

苏铁是雌雄异株，在雌株上着生有大孢子叶球，它是由许多黄褐色、表面密被绒毛、边缘成羽状分裂的大孢子叶组成。大孢子叶排列松散。不形成典型的孢子叶球，外形好像一朵花，所谓“铁树开花”，即指此而言。观察大孢子叶的标本：在大孢子叶的基部两侧，可看到一至数个橘红色裸露的种子，它是由大孢子囊（胚珠）发育而成的。种子大，成核果状，有肉质的外种皮。

观察干制的小孢子叶球。它着生在雄株茎杆的顶端，呈棒状。上面着生有无数螺旋状紧密排列的小孢子叶。在小孢子叶的下面（或称背面）产生许多小孢子囊（花粉囊），通常每 3 个或 4 个聚集在一起。当花粉粒（雄配子体）成熟孢子囊开裂时散出大量的花粉粒。

2. 银杏纲（Ginkgopsida）

银杏（*Ginkgo biloba*）

落叶乔木，枝条有长短枝之分。短枝上叶扇形，长枝上叶上缘二裂，有许多二叉分枝的叶脉。银杏为雌雄异株，用浸制标本分别观察雄球花和雌球花的形状及着生位置：两者皆着生在短枝顶端，小孢子叶（雄蕊）螺旋状着生，轴上成穗状雄球花（小孢子叶球），每个孢子叶是由细而短的柄和两个长形小孢子囊组成。雌花有长柄，顶端有一对胚珠着生，每个胚珠下有略为膨大的珠领（珠托），两枚胚珠中通常仅一枚发育成种子，另一枚退化。

示范镜下观察胚珠结构：辨认珠被、珠孔及珠心。

观察种子的切面：种皮分为肉质的外层、石质的中层和纸质的内层，种皮内有胚和胚乳。

3. 松柏纲（Coniferae）

（1）松科（Pinaceae）

油松（*Pinus tabulaeformis*）

油松是常绿乔木。观察油松的新鲜材料或蜡叶标本：油松叶细长针状，两叶一束，基部有鳞片构成的叶鞘包围。

观察幼年枝条的标本：针叶尚未长出或刚长出，在其新枝基部有丛生的雄球花（小孢子叶球），另一幼枝在其顶端生有一个或二、三个雌花（大孢子叶球），称雌球果。雄球花是由许多小孢子叶聚生在中轴上形成。从浸制的雄球花上用解剖针取下一个孢子叶，用放大镜观察：在每个小孢子的背面有两个小孢子囊，顶端有药隔。观察清楚后，用针

或镊子弄破小孢子囊，即可见小孢子（花粉粒）放出。用显微镜观察，可见花粉粒具有两层细胞壁，外壁有两处与内壁分离而成的气囊，有利于随风散布。

雌球果是由许多大孢子叶聚生在中轴上形成，观察示范的大孢子叶：在大孢子叶腹面（向轴的一面）的基部着生有一对胚珠。

示范镜下观察胚珠结构：辨认珠被（一层）、珠心和珠孔。观察种子已散出的雌球果：整个球果已木质化，种鳞张开，种子散出。标本中可能有的种子还未散开。

雪松（*Cedrus deodara*）

常绿乔木。有长枝和短枝，大枝不规则轮生平展，小枝下垂。树冠形态优美。叶针形，坚硬，在长枝上螺旋状散生，在短枝上簇生。

（2）柏科（Cupressaceae）

侧柏（*Platycladus orientalis*）

叶鳞形，交互对生，小枝扁平，排成一平面，孢子叶球单性。同珠，单生于短枝顶端。雄球花椭圆形，球果当年成熟，熟时开裂。种鳞木质，4 对，扁平，种子 1~2 枚，无翅或有棱脊。

圆柏（*Sabina chinensis*）

常绿乔木，树呈圆锥形，叶鳞形和刺形，同一植株上兼有二形。孢子叶球单性，同株或异株，单生枝顶。球果熟时种鳞愈合肉质，不张开，种子无翅。

（3）杉科（Taxodiaceae）

水杉（*Metasequoia glyptostroboides*）

落叶乔木，叶交互对生（成假二列），小枝对生，冬季小枝和叶脱落。

4. 买麻藤纲（Gnetinae）

（1）麻黄科（Ephedraceae）

草麻黄（*Ephedra sinica*）

草本状灌木。株高 20~40cm。木质茎，小枝直伸或微曲，对生或轮生。叶退化成膜质，交互对生，基部结合成鞘，抱茎，先端 2 裂，裂片三角形；雄球花常成复穗状，具 4 对苞片，雄蕊 7~8，花丝结合，顶端微分离；雌球花单生枝顶或老枝叶腋，有 4 对苞片，顶部苞片内有雌花，雌花有囊状草质顶端开口的假花被，胚珠有 1~2 层膜质珠被包裹，膜质珠被在胚珠上端延伸成珠孔管，自假花被开口处伸出。雌球花的苞片随胚珠的发育通常增厚成肉质，假花被发育成假种皮；每个雌球果有 2 粒种子，种子胚乳丰富。

（2）买麻藤科（Gnetaceae）

买麻藤（*Gnetum montanum*）

为缠绕性常绿木质大藤本，叶对生，革质，卵状椭圆形，长 10~20cm，宽 4.5~11cm，雌雄异株，雌球花排列成穗状花序。

【思考与作业】

1. 用检索表鉴定 3~5 种松科或柏科植物，写出各种的拉丁学名，并给出检索路线。
2. 裸子植物的主要特征是什么？为什么说它比蕨类植物更适于陆生生活？
3. 试比较颈卵器植物形态结构上的主要区别。
4. 蕨类植物比苔藓植物进化又比裸子植物原始的原因是什么？

实验 13　被子植物——木兰科、毛茛科和睡莲科

【实验目的】

1. 掌握木兰科、毛茛科和睡莲科的主要特征。

2. 学会被子植物分科的基本方法。

3. 熟练检索表的使用方法。

【实验材料】

玉兰、荷花玉兰、白兰花、茴茴蒜、毛茛、棉团铁线莲、乌头、莲的彩色投影图片和它们的蜡叶标本。

【实验器材】

多媒体投影设备、放大镜。

【实验内容与步骤】

1. 木兰科（Magnoliaceae）

玉兰（*Magnolia denudata*）

木兰属（*Magnolia*），全株薄壁组织中含有挥发油，花大，整齐，花被片常 9 枚，同形，花瓣状，白色或淡紫色，排列 3 轮；花中心部分为圆柱状的花托；花托下部是多数螺旋状排列的离心雄蕊，花药长形 2 室，纵裂，花丝短；花托上部是多数螺旋状排列的离生心皮；每一心皮有 2 胚珠；花后每个心皮形成一个蓇葖果，成熟后沿着背缝线开裂，整个一朵花中的蓇葖果合称为聚合蓇葖果。种子挂在丝状的珠柄上。

示范：荷花玉兰（*M. grandiflora*）的花及蜡叶标本。

玉兰与荷花玉兰的主要区别：玉兰为落叶乔木，花先叶开放，直径 12~15cm，花被片 9 枚，3 轮排列；荷花玉兰为常绿乔木，花冠直径 15~20cm，叶背和小枝上有锈色短柔毛。

白兰花（*Michelia alba*）

含笑属（*Michelia*），叶为单叶、全缘、互生，叶柄基部有环状托叶痕。雌蕊柄结果时雌蕊轴延长。

注意观察木兰属与含笑属的主要区别：木兰属的花为顶生花序，无雌蕊柄；含笑属为腋生花序，有雌蕊柄。

2. 毛茛科（Rannuculaceae）

茴茴蒜（*Ranunculus chinensis*）

毛茛（*Ranunculus japonicus*）

茴茴蒜和毛茛都是毛茛属（*Ranunculus*）的草本植物，花辐射对称，黄色，花被分化为花萼和花冠，花瓣基部常有蜜腺，雄蕊和心皮多数，离生，螺旋状排列，花托比较明显；聚合瘦果。茴茴蒜的茎和基生叶密生长毛，毛茛无此特征。

棉团铁线莲（*Clematis hexapetala*）

铁线莲属（*Clematis*），直立草本。叶为羽状复叶。聚伞花序生枝或叶腋，花辐射对

称，萼片 6，无花瓣；雌雄蕊多数；瘦果倒卵形，宿存的白色羽状花柱长达 2cm 以上，常生林边或草坡。

乌头（*Aconitum* spp.）

乌头属（*Aconitum*），多年生草本植物。总状花序，花两侧对称为不整齐花；萼片 5，椭圆形，花瓣状，蓝色或紫蓝色，离生或基部相连，上面的萼片盔形，侧萼片 2，近圆形，下萼片 2，较小、近长圆形：花瓣（蜜叶）2，包在盔瓣内，具细长的爪，瓣片通常有距；雄蕊多数；心皮 3~5，花柱短。蓇葖果，种子多数。

3. 睡莲科（Nymphaeaceae）

莲（*Nelumbo nucifera*）

莲属（*Nelumbo*）为多年生水生草本植物。有根状茎（藕）；叶具长柄，高出水面，叶片盾状圆形。花大形，有粉、白两色，花梗长（根状茎、叶柄和花梗有发达的通气组织），萼片 4~5，早落。花瓣多数，雄蕊多数，药隔先端伸出一棒状附属物。心皮多数离生，嵌入花托穴内。

注意子房的位置是属于那种类型？何种胎座（观察不清时看果实）？花托在果时膨大，海绵质，俗称莲蓬，小坚果椭圆形，有几粒种子？

【思考与作业】

1. 写出木兰、毛茛、莲的花程式。
2. 任选一种木兰科、毛茛科植物，绘制其花的解剖结构。
3. 注意观察木兰和含笑的形态特征，应用检索表查对它们的学名，并写出检索路线。
4. 通过实验材料的观察，总结出木兰科、毛茛科及睡莲科的相同特征及不同特征，并说明它们在系统演化上的地位。

实验 14　被子植物——蔷薇科和豆科

【实验目的】

1. 掌握蔷薇科与豆科的主要特点。
2. 学会利用检索表鉴定植物。
3. 了解各科植物的经济意义。

【实验材料】

华北珍珠梅、草莓、秋子梨、西府海棠、山桃、绣线菊、月季、黄刺梅、榆叶梅、苹果、白梨、合欢、紫荆、刺槐等的彩色投影图片，以及它们的新鲜材料或蜡叶标本。

【实验器材】

多媒体投影设备、放大镜。

【实验内容与步骤】

1. 蔷薇科（Rosaceae）

（1）绣线菊亚科（Spiraeoideae）

华北珍珠梅（*Sorbaria kirilowii*）

珍珠梅属（*Sorbaria*），灌木。观察该植物的习性、单叶或复叶、花序的类型。摘一朵刚开放的花进行解剖，注意花托的形状、花瓣的数目及其着生位置；雄蕊的数目和着生位置；雌蕊的心皮数，心皮联合与否，子房为何种位置，果实是哪一种类型？

（2）蔷薇亚科（Rosoideae）

草莓（*Fragaria ananassa*）

草莓属（*Fragaria*），多年生草本，匍匐茎；副萼 5 枚；花瓣 5，白色；雄蕊多数；心皮多数，离生；花托凸出圆锥形，在果时增大，肉质，果实为聚合瘦果，生花托表面。

（3）苹果亚科（Maloideae）

秋子梨（*Pyrus ussuriensis*）

梨属（*Pyrus*），落叶乔木。叶卵圆形，散房花序；花萼 5 枚；花瓣 5 枚，白色；雄蕊多数；雌蕊由 5 个心皮组成，花萼筒与子房壁愈合形成子房下位，花柱 5 条分离，梨果。

西府海棠（*Malus micromalus*）

苹果属（*Malus*），小乔木。仔细观察西府海棠的叶、花瓣和雄蕊、雌蕊，比较西府海棠和秋子梨的异同，总结梨属和苹果属的主要区别。

（4）梅亚科（Prunoideae）

山桃（*Prunus davidiana*）

李属（*Prunus*），落叶乔木，树皮暗紫色，光滑，有光泽。叶卵圆披针形，花单生，萼筒钟状，萼裂片5；花瓣粉红色或白色；雄蕊多数；雌蕊由1 心皮组成，子房上位；花托杯状，核果。

对比观察绣球绣线菊（*Spiraea blumei*）、月季（*Rosa chinensis*）、黄刺梅（*Rosa xanthina*）、榆叶梅（*Prunus triloba*）、白梨（*Pyrus bretschneideri*）及苹果（*Malus pumila*）。

2. 豆科（Fabaceae 或 Leguminosae）

（1）含羞草亚科（Mimosoideae）

合欢（*Albizzia julibrissin*）

合欢属（*Albizzia*），落叶乔木，二回偶数羽状复叶，头状花序多数，散房状排列，花无梗，花萼管状，多具 5 齿，花冠小，淡黄绿色，花瓣有一半以上联合，镊合状排列；雄蕊多数，仅基部稍连合，花丝长，红色；雌蕊由 1 枚心皮组成，花柱比雄蕊稍长。荚果扁平，带状，无果肉，通常不裂开。

（2）苏木亚科（Caesalpinoideae）

紫荆（*Cercis chinensis*）

紫荆属（*Cercis*）植物，在野生状态下为乔木，栽培时成灌木，单叶互生。花先叶开放，4~10 朵簇生于老枝上，花萼钟状，有 5 短钝齿，红色；花瓣 5 枚，不整齐，上面 3 片较小，上升复瓦状排列；雄蕊 10 枚，分离，雌蕊由 1 枚心皮组成，荚果，褐色、扁平，通常不裂。

（3）蝶形花亚科（Papillionatae）

刺槐（*Robinia pseudoacacia*）

洋槐属（*Robinia*），落叶乔木，树皮褐色，有深沟；一回羽状复叶。总状花序下垂，花萼钟状，5 齿裂，稍 2 唇形；花瓣 5，不整齐，下降复瓦状排列，成蝶形花冠；雄蕊

10 枚，9 枚联合，1 枚分离，称为 2 体雄蕊；雌蕊由 1 枚心皮组成，荚果。

同时与其他材料作对比观察，从中总结出豆科植物的主要识别特征及三个亚科的主要特征。

【思考与作业】

1. 写出珍珠梅、月季和秋子梨的花程式。

2. 分别比较蔷薇科各亚科和豆科各亚科间的分类特征。

实验 15　被子植物——十字花科、锦葵科、藜科和杨柳科

【实验目的】

1. 掌握十字花科、锦葵科、藜科和杨柳科的主要特征。

2. 在熟练使用检索表鉴定植物的基础上，学会编制植物检索表。

【实验材料】

大白菜、蜀葵、苘麻、野西瓜苗、甜菜、菠菜、毛白杨、旱柳的彩色投影图片，蜀葵、苘麻、野西瓜苗、毛白杨、旱柳的蜡叶标本和部分新鲜材料。

【实验器材】

多媒体投影设备、实体解剖镜、放大镜。

【实验内容与步骤】

1. 十字花科（Cruciferae）

大白菜（*Brassica pekinensis*）

芸薹属（*Brassica*），二年生草本植物。第一年只在短茎上生大而多汁的基生叶片，翌年茎延长生出较小的抱茎叶。总状花序生枝顶；花淡黄色，两性。萼片 4，花瓣 4，成十字形花冠；雄蕊 6 枚，4 长 2 短，成四强雄蕊，基部有 4 枚绿色蜜腺；雌蕊由 2 枚合生心皮组成，子房上位，由假隔膜隔成假 2 室，侧膜胎座，胚珠多数，长角果，有长喙，果瓣具 1 条明显中脉，种子棕褐色，近球形，子叶对褶。

十字花科中芸薹属最重要，很多种是我们常吃的蔬菜，为了便于查找本属常见蔬菜的区别特征，现将常见的蔬菜植物做一检索表，以作参考。

1 植物体具肥大圆锥状根和茎（球状或扁球形）。

　2 植物体具肥大球状或扁球形的地上茎；叶厚、蓝绿色，被白粉……………………………………………………………………………………芥蓝头（*B. caulorapa*）

　2 植物体具肥大圆锥状根。

　　3 花大，长 1.5~2cm，叶具辣味…………………………大头菜（*B. napobrassica*）

　　3 花小，长 9cm，叶具辣味……………………………………………………芜菁（*B. rapa*）

1 植物体不具肥大根和茎。

　4 花较大，长 1~3cm，花瓣下部延长成狭的爪，萼片直立；茎、叶具白粉。

　　5 花序密集或叶紧抱呈球状。

6 叶紧抱呈球状……………………洋白菜（圆白菜）（*B. oleracea* var. *capiata*）

6 花序缩成肉质球状………………………………菜花（*B. oleracea* var. *botrytis*）

5 花序或叶不成球状，叶片皱缩，颜色多变……………………………………………

………………………羽衣甘蓝（*B. oleracea* var. *acephala* f. *tricolor*）（供观赏）

4 花较小，长约 1cm，花瓣下部的爪不显著，萼片常开展，茎及叶不具或微被白粉。

7 茎上部的叶不抱茎，植物体具辣味。

8 叶不分裂或大头羽状深裂，裂片宽………………………………芥菜（*B . juncea*）

8 叶羽状浅裂，裂片狭窄，边缘卷，且皱缩……雪里红（*B. juncea* var. *multiceps*）。

7 茎上部叶抱茎，植物体无辣味。

9 基生叶不裂或基部有 1~2 对不明显的裂片。

10 基生叶紧密排列呈莲座状，深绿色……………瓢菜（塌古菜）（*B. narinosa*）

10 基生叶不紧密排列呈莲座状，绿色或淡绿色。

11 基生叶的叶柄宽而具翅，叶无白粉，背面沿中脉处具疏生的毛……………

………………………………………………………………白菜（*B. pekinensis*）

11 基生叶的叶柄不具翅，叶无毛，稍具白粉………………………………………

………………………………………………………青菜（油菜）（*B.chinensis*）

9 基生叶大头羽状裂，侧主裂片 5 对，茎生叶基部两侧具垂耳…………………

………………………………………………………………油菜（*B.campestris*）

十字花科常见的植物还有萝卜（*Raphanus sativus*）、独行菜（*Lepidium apet-alum*）、荠菜（*Capsella bursa-pastoris*）和紫萝兰（*Matthiola incana*）等，做对比观察。

2. 锦葵科（Malvaceae）

蜀葵（熟季花）（*Althaea rosea*）

蜀葵属（*Althaea*），多年生草本，为常见草花。茎直立，高可达 3m，塔形。全株具粗毛。叶大，粗糙而皱，圆心形；长总状花序；花大，有黄、红、紫、白等色，萼片 3~5 枚，基部常有副萼；花瓣 5，分离或重瓣，雄蕊多数，花丝结合成柱状，为单体雄蕊，花药 1 室，雌蕊多数合生，子房上位，中轴胎座。蒴果，分离成数个分离果瓣，成熟时自中轴脱落。

草棉属（*Gossypium*）是该科最有经济价值的植物，观察陆地棉（*G. hirsutum*）的花及果实，棉花是植物的哪一部分？注意草棉属与蜀葵属的区别。

还可观察苘麻（*Abutilon theophrasti*）、野西瓜苗（*Hibiscus trionum*）的标本。

3. 藜科（Chenopodiaceae）

甜菜（*Beta vulgaris*）

甜菜属（*Beta*），二年生植物，具肉质肥大的圆锥根，第一年生基生叶，第二年生茎生叶，互生。花排成顶生的圆锥花序，单被花，注意雄蕊的数目和萼片的排列关系，雌蕊有无花柱？柱头是否分裂？子房是什么位？观察果实是什么类型的果实？果外包有什么？胚是什么形状？甜菜种子的外胚乳是由什么发育而来的？根为制糖原料。

菠菜（*Spinacia oleracea*）

菠菜属（*Spinacia*），一年生草本，根常带红色；茎直立。中空；叶戟形呈卵形，鲜

绿色，雌雄异株，雄花成顶生的圆锥花序，雌花丛生叶腋，结果时，2个小苞片合生，将胞果包住，小苞片的顶端形成单刺或分枝刺。

常见的藜科植物还有藜（灰菜）（*Chenopodium album*）、灰绿藜（*C. glaucum*）、小藜（*C. serotinum*）、地肤（*Kochia scoparia*）、盐地碱蓬（*Suaeda salsa*）和碱蓬（*S. glauca*）。紫菜头（*Beta vulgaris* var. *rosea*）根球形，紫红色，肥厚，可作蔬菜。

4. 杨柳科（Salicaceae）

毛白杨（*Populus tomentosa*）

杨属（*Populus*），落叶乔木，具顶芽，芽鳞多枚。叶片三角状卵形，雌雄异株，雌雄花均排列为下垂的柔荑花序，注意观察雌雄花的特点：果为何果？找出种子，种子上生有何物？

旱柳（*Salix matsudana*）

柳属（*Salix*），落叶乔木，无顶芽，芽鳞1片，雌雄异株，雌雄花均为直立的柔荑花序。分别取雌、雄花观察。通过毛白杨和旱柳的观察总结出杨属与柳属的区别及杨柳科的识别特征。

【思考与作业】

1. 编写本实验中十字花科、锦葵科、藜科和杨柳科四个科的分科检索表。
2. 任选5种十字花科常见蔬菜植物，请编制一个区分它们的检索表。

实验16　被子植物——木犀科、旋花科、唇形科和菊科

【实验目的】

1. 掌握木犀科、旋花科、唇形科和菊科的主要特征。
2. 掌握检索表的使用方法和编制检索表。

【实验材料】

紫丁香、连翘、毡毛梣、打碗花、夏至草、一串红、益母草、蒲公英、向日葵、泥胡菜、蒙山莴苣的彩色投影图片和它们的蜡叶标本或新鲜材料，紫丁香、连翘、毡毛梣、夏至草、蒲公英花的浸制标本。

【实验器材】

实体解剖镜、解剖针、多媒体投影设备。

【实验内容与步骤】

1. 木犀科（Oleaceae）

紫丁香（*Syringa oblata*）

丁香属（*Syringa*），灌木，单叶对生，花紫色，圆锥花序。取一朵花观察，写出花程式。

梣属（白蜡树属，*Fraxinus*）毡毛梣（绒毛白蜡，*Fraxinus velutina*）是天津市市树，

为常见的行道树。落叶乔木，羽状复叶，对生。注意花的结构，找出梣属和丁香属的区别。

与其他木犀科植物，如连翘（*Forsythia suspensa*）做对比观察。

2. 旋花科（Convolvulaceae）

打碗花（*Calystegia hederacea*）

打碗花属（*Calystegia*），一年生缠绕或平卧草本，为常见杂草。茎具细棱，通常基部分枝，叶片三角状卵形，戟形或箭形，花单生于叶腋，花梗长于叶柄，苞片 3，较大，紧贴萼外，花冠漏斗状，淡粉红色或淡紫色，观察花的结构，写出花程式。

比较观察牵牛（*Pharbitis nil*）、田旋花（*Convolvulus arvensis*）和菟丝子（*Cuscuta chinensis*）的标本。

3. 唇形科（Labiatae）

夏至草（*Lagopsis supina*）

夏至草属（*Lagopsis*），二年生小草本。茎四棱，叶对生，掌状三全裂。轮散花序 6~10 花，小花苞片与萼筒等长，刚毛状花萼，顶端 5 尖刺的齿，上齿较下唇 2 齿为短，花冠白色，上唇直立，较下唇为长，下唇开展，有 3 裂片；雄蕊 4 枚，2 强，不伸出；雌蕊由 2 心皮组成，花柱着生于子房基部，子房 4 深裂。小坚果 4 枚，褐色。

与同科其他植物，如一串红（*Salvia splendens*）、益母草（*Leonurus heterophyllus*）做对比观察。

4. 菊科（Compositae）

蒲公英（*Taraxacum mongolicum*）

蒲公英属（*Taraxacum*），多年生小草本。有乳汁，根肥厚，圆锥形；叶基生，匙形或倒披针形。常成逆向羽状分裂，稀全缘。花莛直立，中空，头状花序单生花莛顶端；总苞钟形，苞片通常多层，复瓦状排列；全为黄色舌状花，萼片退化成冠毛。花冠联合，先端有 5 齿，聚药雄蕊，花药黑色；雌蕊由 2 心皮组成，花柱顶端 2 裂，瘦果纺锤形，暗褐色，有条棱，具刺状突起，先端有长喙，冠毛简单，白色。

向日葵（*Helianthus annuus*）

向日葵属（*Helianthus*），一年生草本。全株有刚毛，头状花序大形，径达 25cm，总苞片 2~8 层，外层叶状，花序轴扁平，不裸露，边花舌状，中性或雌性、黄色，有引诱昆虫的作用；盘花管状，两性，每朵管状花基部有 1 片膜质的苞片，叫托片；花萼退化成两个鳞片，花冠管状，整齐，雄蕊 5，着生花冠管上，雌蕊 2 心皮组成。内含 1 基生胚珠。瘦果，种子无胚乳，含油量 40%。

对比观察泥胡菜（*Hemistepta lyrata*）和蒙山莴苣（*Lactuca tatarica*）。

【思考与作业】

1. 根据对实验材料的观察，分别总结木犀科、旋花科、唇形科和菊科植物的分类学特征。

2. 绘图说明连翘花的结构特征。

3. 选 6 种或 6 种以上自己观察过的植物，编写它们的分种检索表。

4. 课外观察，鉴定校园里的玄参科（Scrophulariaceae）和紫草科（Boraginaceae）

植物。

实验 17　被子植物——泽泻科、百合科、禾本科和莎草科

【实验目的】

1. 掌握单子叶植物泽泻科、百合科、禾本科和莎草科的主要特征。
2. 掌握双子叶植物与单子叶植物的主要区别。
3. 掌握编制和使用植物检索表。

【实验材料】

泽泻、慈姑、百合、文竹、大葱、蒜、小麦、扁秆藨草的彩色投影图片和部分新鲜材料，以及它们的蜡叶标本。

【实验器材】

多媒体投影设备、实体解剖镜。

【实验内容与步骤】

1. 泽泻科（Alismataceae）

泽泻（*Alisma orientale*）

泽泻属（*Alisma*），多年生沼生草本植物。须根，叶基生，有长柄，叶片长椭圆形，花萼长。顶生圆锥花序，有苞片；花萼 3，花瓣 3，白色，倒卵形，早落；雄蕊 6；心皮多数离生。瘦果多数，扁平。

野慈姑（*Sagittaria trifolia*）

慈姑属（*Sagittaria*），多年水生草本植物，有匍匐枝，先端有小球茎，叶基生，叶柄长，戟形。花茎长，总状花序，花多，在每节轮生，单性，雌花生于下方，雄花有稍长的小梗；雌花萼片 3 枚；花瓣 3 枚，白色，长为萼片的 2 倍；心皮多数，密集成球形；雄花有多数雄蕊，瘦果斜倒卵形。

2. 百合科（Liliaceae）

百合（*Lilium brownii* var. *viridulum*）

百合属（*Lilium*），多年生草本，鳞状茎球形，茎高约 0.7~1.5m。花单生或 2~4 朵排成伞形，花被片 6 枚，多为白色，有时背面带紫褐色，前端外弯而不卷。雄蕊 6 枚，着生于花被片基部。柱头 3 裂，蒴果长圆形，长约 5cm，有多数种子。

文竹（*Asparagus setaceus*）

天冬属（*Asparagus*），多年生草本或亚灌木，茎拱垂，主茎上的退化叶针刺状，叶状枝扁平，线形，通常 2~4 枚簇生。总状花序，着生小枝基部，或在小枝上和叶状枝同生一簇。花小形，花被片 3，同形，白色，6 枚 1 轮，离生；雄蕊 6，与花被片对生；雌蕊由 3 心皮组成，子房上位，3 室，浆果红色，球形。

观察其他百合科植物，如葱（*Allium fistulosum*）、大蒜（*Allium sativum*），并总结百合科的共同特征。

3. 禾本科（Gramineae）

小麦（*Triticum aestivum*）

小麦属（*Triticum*），二年生草本，分蘖形成疏丛，杆圆形，中空，节明显，叶2行排列，叶鞘短于节间，开放式，叶舌短小；膜质，有叶耳，叶片披针形。复穗状花序直立，小穗含3~9朵花，上部的花不结实，每节生一小穗，小穗无柄，两侧压扁，以侧面对梗轴，小穗脱节于颖之上；颖革质，外稃厚、纸质，顶端通常有芒，内稃和外稃等长；浆片2枚，在外稃内侧；雄蕊3枚；雌蕊由2心皮组成，子房上位，1室，1胚珠，柱头有羽毛状颖果。

与其他禾本科植物做比较观察。

4. 莎草科（Cyperaceae）

扁杆藨草（*Scirpus planiculmis*）

藨草属（*Scirpus*），多年生草本，具匍匐根状茎和块茎。杆三棱形，叶3行排列，叶鞘闭合，叶片狭长，无叶耳和叶舌。聚伞花序缩成头状，有叶状总苞苞片1~3个，比花序长；小穗1~6枚，小穗卵形或长圆状卵形，锈褐色，有多数小花，每小花有1膜质鳞片；花被片为刚毛状，4~6枚，上生倒刺；雄蕊3枚，雌蕊由2心皮组成，花柱长，柱头2枚，小坚果扁平，两面稍凸。

对比观察其他莎草科植物。

【思考与作业】

1. 泽泻科和百合科的主要特征是什么？它们在分类系统上的地位如何？
2. 比较禾本科与莎草科的异同点。
3. 编写泽泻科、百合科、禾本科和莎草科等4个科植物的分科检索表。

实验18　水 生 植 物

【实验目的】

1. 掌握水生植物的主要特征。
2. 了解植物与环境的相互关系。
3. 比较与陆生植物的主要差别。

【实验材料】

穗状狐尾藻、菹草、金鱼藻、大茨藻、风眼莲、浮萍、紫萍、荇菜、水鳖、香蒲的彩色投影图片和蜡叶标本或新鲜材料，以及部分植物的浸制标本。

【实验器材】

多媒体投影设备、实体解剖镜、放大镜、解剖针。

【实验内容与步骤】

1. 沉水植物

（1）小二仙草科（Haloragidaceae）

穗状狐尾藻（*Myriophyllum spicatum*）

狐尾藻属（*Myriophyllum*），沉水植物。茎光滑，长达2m，根状茎生于泥中，叶4枚轮生，无柄，丝状全裂；穗状花序生枝顶，花两性或单性，雌雄异株，常4朵轮生花序轴上，雄花位于花序上部，雌花位于花序下部，花有苞片及小苞片，雌花萼筒管状，花瓣4，早落，甚小，子房下位，四室；雄花萼筒广钟状，花瓣4，早落，雄蕊8，果球形。

本种与轮叶狐尾藻的营养体甚相似，不同点在于轮叶狐尾藻裂片较粗、短、成线形，花序生叶腋。

（2）眼子菜科（potamogetonaceae）

菹草（*Potamogeton crispus*）

眼子菜属（*Potamogeton*），多年生草本，根状茎细长，茎多分枝，略扁平，分枝顶端常结芽苞又称石芽，脱落后成新植株。叶宽线形，长4~7cm，宽5~10mm，边缘常皱折或呈波状，穗状花序生茎顶叶腋，开花时伸出水面，花序柄粗壮，花序长1~1.5cm，花少。果有喙。

（3）金鱼藻科（Ceratophyllaceae）

金鱼藻（*Ceratophyllum demersum*）

金鱼藻属（*Ceratophyllum*），沉水植物，茎平滑而细长。叶5~10枚轮生，无柄，长1~2cm；1~2回叉状分枝，裂片线形，边缘有散生的刺状细齿，花小，雌雄同株。

（4）茨藻科（Najadaceae）

大茨藻（*Najas marina*）

茨藻属（*Najas*），一年生沉水草本，高达70cm，柔软，多分枝，具稀疏的锐尖短刺、叶对生，挺坚，线形至椭圆状线形，边缘有粗齿，每侧6~11个，两面中脉处常有数个刺状的棘突。

对比观察水鳖科的苦草（*Vallisneria asiatica*）。

2. 漂浮植物

（1）雨久花科（Pontederiaceae）

凤眼莲属的凤眼莲（*Eichhornia crassipes*）

又叫水葫芦，多年生漂浮植物。须根发达，悬垂水中。叶丛生在缩短茎基部。叶片卵形、倒卵形至肾状圆形，光滑，叶柄中下部有膨胀如葫芦状的气囊，基部有鞘状苞片。穗状花序有6~12朵花，花被6片，紫蓝色，上面1片较大，中央有鲜黄色的斑点，另外5枚相等；雄蕊3长3短，雌蕊由3心皮合生，子房上位，3室，胚珠多数。蒴果，一般靠腋芽来发育成新植株，繁殖极为迅速。原产南美，我国引种。

（2）浮萍科（Lemnaceae）

浮萍（*Lemna minor*）

浮萍属（*Lemna*），浮水小草本，植物体退化成1个小的叶状体呈倒卵状椭圆形，长1.5~6mm，两面均为绿色，具1条毛状根，常以叶状体的侧边生出新的叶状体进行无性繁殖。少见开花。

紫萍（*Spirodela polyrrhiza*）

紫萍属（*Spirodela*），浮水小草本。根5~11条。聚生于叶状体下面的中央。叶状体卵圆形，长4~10mm，宽4~8mm，1个或2~5个簇生，上面绿色，下面紫色，在根的着生处一侧产生新芽，新芽脱离母体成为一新叶状体。

3. 浮叶植物

龙胆科（Gentianaceae）

荇菜（*Nymphoides peltatum*）

荇菜属（*Nymphoides*），多年生草本。多分枝，具不定根。于水底泥中生地下茎，叶圆状心脏形，上部对生，其他互生，花簇生叶腋，花柄长，萼片5，近分离，花冠辐射状，5深裂，黄色，喉部有长毛，雄蕊5，雌蕊2心皮合生，子房上位，1室，柱头瓣状2裂。蒴果，长椭圆形，种子多数。

对比观察水鳖科水鳖（*Hydrocharis dubia*）。

4. 挺水植物

香蒲科（Typhaceae）

水烛（*Typha angustifolia*）

香蒲属（*Typha*），水生或沼泽多年生草本，具匍匐根状茎，叶线形，肉穗花序，雌雄同株，花序上部为雄花，下部为雌花，雄花和雌花紧密相连或有一段间隔。

该科其他常见植物有小香蒲（*T. minima*）和达香蒲（*T. davidiana*）。

另外观察禾本科、莎草科的挺水植物。

【思考与作业】

1. 从观察过的水生植物中选5种，列出它们的分种检索表。

2. 思考水生植物在自然水体生态系统中的作用。

实验19　综合鉴定校园内外常见植物

【实验目的】

通过前面实验中已基本掌握的实验方法和技能，利用检索表对校园植物进行鉴定，以期达到能够独立进行植物鉴定的能力。

【实验材料】

自采校园至少10种植物（部分植物要有花），带到实验室进行鉴定。

【实验器材】

实体解剖镜、解剖针、放大镜、《天津植物志》、《河北植物志》、《北京植物志》、《东北植物检索表》。

【实验内容与步骤】

1. 用花程式描述植物花的主要特征

花程式是借助于一些植物有关器官的原文省略字母和数字来表示花各部分的结构及其数量关系。方法简便，记述扼要，有助于学习。花各部分的代称如下：

P：花被，Peranthium的略写。

K：萼片，德文Kelsh的略写。

C：花瓣，Corolla的略写。

A：雄蕊群，Androecium的略写。

G：雌蕊群，Gynoecium 的略写。

以数字表明花的各轮数目，写在所表示部分的符号的右下角。

∞：数目多或不定数。

O：不具备或退化。

G（a:b:c）：后三个字，a 示心皮数，b 示每个子房室数，c 示每室内胚珠数。

+：排列轮数。

（ ）：联合。不带（ ）示分离。

$\underline{G}$：子房上位。

*：整齐花（辐射对称）。

↑：不整齐花（两侧对称）。

←：某一部分着生在另一部分，如 C ← A 示雄蕊着生在花冠上。

2. 绘制植物形态特征图及花图式

绘制植物形态特征图，正确观察植物材料、掌握其主要特征之后，用硬铅笔绘出植株的一部分或某器官的一部分（特别是分类上鉴别特征），绘图时要特别注意各部分的形状、比例大小、相互关系，要按典型的完整的代表植物来绘，绘制完毕要逐一标明各部分名称及放大或缩小倍数，准确的形态图有助于我们在正确地鉴定植物时提供参考。

花图式是用符号表示花蕾的横切面图，它与花程式不同，但必须互相参照。花图式不仅表明花的构造和花各部分的数量，同时也表明花各部分在空间排列的相对位置以及其他重要特点。

此外，有些花图式中，还表明花结构的一些特点，例如副萼、距、蜜腺以及花冠、雄蕊的形状等，应灵活辨认并加以运用。

3. 识别植物的主要特征

有比较才能鉴别，辨认植物要学会比较，从比较中抓住鉴别特征，这是学习植物分类学的重要方法。利用植物的相同点可决定于它们同属于某一科、属或种。利用这一方法，编制成检索表，使用已编检索表，可以根据备查植物的特征用检索表检索出我们要鉴定的植物；再查阅有关参考书的有关描述，是否与检索出的植物特征相同。另外，也可与标本室所藏标本相对照、验证其特征是否相同。

根据以上考证的结果，就可判断我们检索的植物是否正确。

4. 检索表的制作和使用

植物分类检索表对学习分类学是一个很重要的工具。在鉴定植物时就需依靠检索表进行。但检索表的编制完全是人为的，并不代表植物的自然关系。检索表是将一群植物的主要特征，两两对比，逐步排列，直至排列到某一种或某一群（科或属）的植物为止。查检索表时应先观察待鉴定植物的形态特征，确定所属科。再用检索表检索出属、检索出种。每查出一种分类等级后，均应与文献记载的该等级的特征详细对照，经证实其特征完全相符后，才能查出下一等级，否则就会一错再错，以致查不下去，或者造成错误鉴定。检索表排列方式常用的有两种，即定距式检索表和平行式检索表。

定距式检索表：优点是层次清楚，使用方便；缺点是比较费纸。

平行式检索表：优点是整齐，省纸；缺点是层次不清楚，使用不方便。

以植物界划分为例。

定距式检索表：

1 植物体无胚胎，为单细胞或多细胞组成叶状体，没有真正根茎叶的分化。

  2 植物体不是由藻类和菌类组成的共生体。

   3 植物体有叶绿素或其他光合色素，能自己制造食物……………………藻类植物

   3 植物体没有叶绿素或其他光合色素，不能自己制造食物……………菌类植物

  2 植物体由藻类，菌类共生组成………………………………………………地衣植物

1 植物体有胚胎，为多细胞组成，常分化为根、茎、叶或为假的根、茎、叶。

  4 植物体有茎、叶分化，但无真根…………………………………………苔藓植物门

  4 植物体有茎、叶分化，有真正的根。

   5 植物体不开花，没有种子，只有孢子，靠孢子繁殖……………蕨类植物门

   5 植物体开花，产生种子，靠种子繁殖。

    6 胚珠裸露，不包于子房内，不形成果实…………………………裸子植物门

    6 胚珠不裸露，包于子房内，形成果实……………………………被子植物门

平行式检索表：

将上述定距式检索表特征按平行式检索表方式排列：

1 植物体无胚，为单细胞或多细胞组成叶状体，没有真正根茎叶的分化…………2

1 植物体有胚，为多细胞组成，常分化为根、茎、叶或为假的根茎叶……………………4

2 植物不是由藻类和菌类组成的共生体…………………………………………………3

2 植物是由藻类和菌类组成的共同体……………………………………………地衣植物

3 植物体有叶绿素或其他光合色素，能自己制造食物………………………藻类植物

3 植物体没有叶绿素或其他光合色素，不能自己制造食物…………………菌类植物

4 植物体有茎叶分化，但无真根……………………………………………苔藓植物门

4 植物体有根茎分化，有真正的根…………………………………………………… 5

5 植物体不开花，没有种子；有孢子，靠孢子繁殖……………………蕨类植物门

5 植物体开花，产生种子，靠种子繁殖………………………………………………6

6 胚珠裸露，不形成果实……………………………………………………裸子植物门

6 胚珠不裸露，包于子房内，形成果实……………………………………被子植物门

5. 如何认识植物拉丁名

植物拉丁名是植物在国际上统一使用的科学名称，即学名。学名是用拉丁文或拉丁化了的文字命名的。各分类等级都有拉丁名。其中以种的拉丁名最重要，一般种的拉丁名是由属名加种加词（种名）再附命名人的姓氏组成。如油菜 *Brassica chinensis* L.中，*Brassica* 为芸薹属，*chinensis* 为种加词，即中国的，L.为瑞典植物学家林奈 Carolus Linnaeus 的缩写。属名第一个字母必须大写。种加词第一个字母一律小写，人名第一个字母大写，如水杉 *Metasequoia glyptostroboides* Hu et Cheng, *Metosequoia* 是属名，*glyptos- troboides* 是种加词， Hu 是我国植物学家胡先骕的姓，Cheng 是我国植物学家郑万均的姓。学名除上述标准形式外，还有其他情况。

（1）异名 Synonyms 缩写为 syn.或用——或（ ）表示，也可以用斜体字表示。

异名即为同物异名。每种植物只能有一个合法的学名，如有其他名称，只能作为异名，例如，台湾松（*Pinus taiwanensis* Hayata）的异名为黄山松（*P. hwangslanensis* Hsia）。经研究，黄山松与台湾松的特征相同，是同一种植物，按规定应以最先发表的学名为正式学名，其他学名均作为异名。

裂叶牵牛[*Pharbitis nil*（L.）Choisy]的异名为（*Convolvulus nil* L.），林奈发表此种，当时把属名误定为旋花属（*Convolvulus*）。Choisy 认为应是牵牛属，就把它并入牵牛属，按规定应仍用 *nil* 种加词，因此在 Choisy 名的前面写上 L.，但要用（ ）括起来，并将林奈定的学名作为异名处理。

（2）在两个定名人之间用 et、&、ex 相连。et、&是"and"、"及"、"和"的意思，表示此植物的学名是由两个人共同定的，如前面的水杉是由胡先骕和郑万均两位植物学家共同定的。

ex 是"从"、"根据"之意，如藏麻黄（*Ephedra saxatilis* Royle ex Florin），Royle 为最初定名人，但未正式发表，后由 Florin 研究，同意这个学名，并正式发表，于是在 Royle 后面加上 ex 再加 Florin，表示这个学名应以 Florin 的研究为依据。

（3）拉丁名中一些缩写词。

ssp.或 subsp.：是亚种 subspecies 的缩写。例如，云南藜（*Chenopodium album* L. ssp. *yunnanensis*）为藜（*Chenopodium album* L.）的亚种。

sp.或 spp.：是 species 的缩写，写在属名后面，表示未定种。如 *Chenopodium* sp.表示藜属中的一个未定种，*Chenopodium* spp.表示藜属中的多个未定种。

sp.nov：是 species nova 的缩写，意思是新种，一般附在新发表的学名之后。

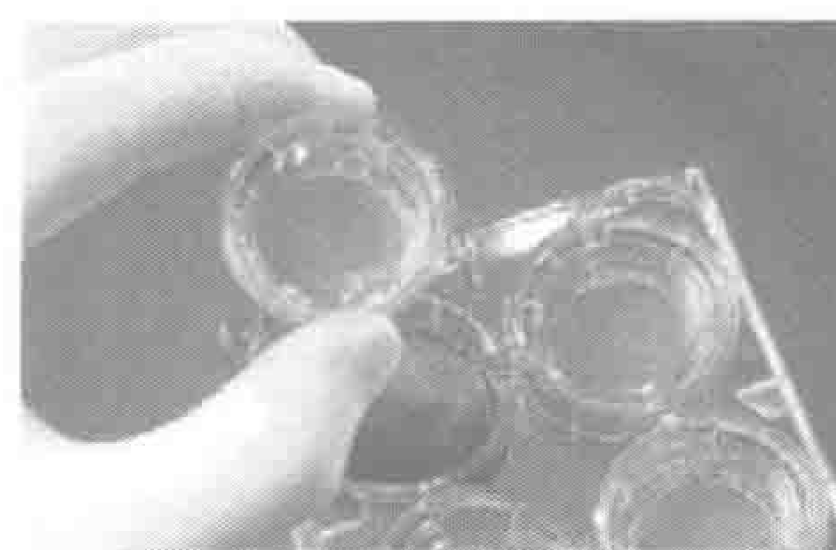
var.：是 varietas 的缩写，是变种的意思。如酸枣（*Ziziphus jujuba* Mill var. *spinosa* Hu ex H.F.Chow）是枣（*Ziziphus jujuba* Mill）的变种。

f.：是 forma 变型的缩写。

例如，*Prunus serrulata* Lindl.f. *rosea-plena* Hort，为重瓣樱花，是樱花(*Prunus serrulata* Lindl.）的变型。

【思考与作业】

1. 用检索表鉴定 10 种以上的植物，并写出检索路线。
2. 举 10 种校园植物，列出并区分它们的定距式检索表。



第三部分

生理篇

实验 20　植物组织水势的测定

【实验目的】

1. 掌握小液流法测定植物组织水势的原理和方法，以及水势差是渗透系统中水分移动方向的决定因素。

2. 明确压力平衡法测定水势的原理，了解操作方法。

3. 掌握露点法测定水势的原理和使用方法，并能比较几种测定水势方法的优缺点。

【实验原理】

水势和渗透势是衡量植物水分状况的重要参数。水势与渗透势的测定方法可分为三大类，除液相平衡法（包括小液流法、重量法测水势，质壁分离法测渗透势）和压力平衡法（压力室法测水势）外，还有一类是气相平衡法，包括热电偶湿度计法、露点法等。液相平衡法所需仪器设备简单，但手续繁琐、效率低，难以自动记录；压力平衡法适于测定枝条或整个叶片的水势，对于小型样品如叶圆片等则无能为力。气相平衡法能广泛用于各种植物叶片水势和渗透势的测定，所需样品量极少、测量精度高，是近年来发展起来的一类较好的植物水势及其组分的测定技术。

Ⅰ 小液流法

植物组织的水分状况可用水势（代表水的能量水平）来表示。水总是从水势高处向水势低处流。植物组织间、细胞间、植物体及环境间的水分移动都是由水势决定的。如果将植物组织分别放在一系列浓度递增的溶液中，当我们找到某个浓度溶液与植物组织之间水分保持动态平衡，并表现出无水分的单向移动时，则可以认为植物组织的水势等于溶液的渗透势。因溶液的浓度是已知的，可以根据公式算出其渗透势，即代表植物组织的水势。

$$\Psi = \psi_s, \qquad \psi_s = -iCRT \tag{20-1}$$

式中，ψ_s：欲测的渗透势（MPa）；i：溶液的等渗系数，蔗糖为 1（NaCl 为 1.5）；R：气体常数，为 0.083 14；C：溶液的质量摩尔浓度（mol/L）；T：绝对温度（273）+实验过程的温度（℃）。

【实验材料】

土豆或其他植物组织。

【器材和试剂】

1. 器材

试管 20 支、移液管、胶头毛细管、剪刀、试管架。

2. 试剂

甲烯蓝、1mol/L 的蔗糖溶液。

【实验内容与步骤】

（1）配制一系列浓度不同的蔗糖溶液，分别是：0.5mol/L、0.4 mol/L、0.3 mol/L、0.25 mol/L、0.2 mol/L、0.15 mol/L、0.1 mol/L、 0.05 mol/L 各 10mL，共 8 管。注入试管中，各管都加上塞子，或用铝箔纸包住管口，并编号，按编号顺序排成一列，放在试管架上，作为对照组。

（2）另用 8 支试管，编号，按顺序放在试管架上，作为试验组，然后由对照组各试管中分别取溶液 2mL，移入相同编号组的各试管中，再将各试管加上塞子。

（3）用解剖刀（或剪刀）将土豆或其他植物组织切（剪）成 0.2~0.5cm 大的小块，混合均匀后，向试验组的每个试管中投入 15~20（块）片（每管加的量需相等），加塞并经常摇动，30min 后，向试验组的每支试管中各加一滴甲烯蓝溶液，并摇动试管，使溶液均匀着色。

（4）用胶头毛细管（或小量程移液管）吸取浸有材料的蓝色溶液，然后插入对照组相同编号的试管中，在液体的中部轻轻放出一滴蓝色试验溶液，仔细观察液滴移动的方向，并记录之。

表 20-1　观察结果记录表

溶液浓度/（mol/L）	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
液滴移动的方向								

（5）根据公式计算出植物组织水势。

【注意事项】

1. 土豆块放入试管后， 要盖好试管塞， 以防水分蒸发影响实验结果。
2. 加入实验组的甲烯蓝溶液量不易太多，以免影响溶液的密度。
3. 胶头毛细管要各溶液专用，如用一只滴管则应从低浓度到高浓度依次吸取溶液。
4. 释放蓝色液滴时要缓慢，防止过急挤压冲力影响液滴移动。
5. 观察液滴移动状况，最好放在白色背景下进行。

【思考与作业】

1. 加入甲烯蓝溶液会影响实验结果吗？为什么？
2. 如果小液滴在各对照溶液中全部上升（或下降），说明什么问题？

Ⅱ　露点法测定植物叶片水势和渗透势

将植物组织（如叶片）或组织汁液密闭在体积很小的样品室内，经一定时间后，样品室内的空气和植物样品将达到温度和水势的平衡状态。此时，气体的水势（以蒸气压表示）与叶片的水势（或组织汁液的渗透势）相等。因此，只要测出样品室内空气的蒸气压，便可得知植物组织的水势（或汁液的渗透势）。由于空气的蒸气压与其露点温度具有严格的定量关系，本仪器便通过测定样品室内空气的露点温度而得知其蒸气压。该仪器装有高分辨能力的热电偶，热电偶的一个结点便安装在样品室的上部。测量时，首先给热电偶施加反向电流，使样品室内的热电偶结点降温（Peltier 效应），当结点温度降至露点温度以下时，将有少量液态水凝结在结点表面，此时切断反向电流，并根据热电偶

的输出电位记录结点温度变化。开始时，结点温度因热交换平衡而很快上升；随后，则因表面水分蒸发带走热量，而使其温度保持在露点温度，呈现短时间的稳衡状态；待结点表面水分蒸发完毕后，其温度将再次上升，直至恢复原来的温度平衡。记录稳衡状态下的温度，便可将其换算成待测样品的水势或渗透势。

【实验材料】

植物离体或活体材料，如叶片等。

【实验器材】

美国 Decagon Device 公司生产的 WP-4 型水势仪，采用冷镜露点技术来测量样品的水势。

【实验内容与步骤】

1. 样品的准备

把样品放入样品杯中，尽可能覆盖杯的底部。WP-4 型水势仪可以测量没有完全覆盖的样品，但是大的样品表面积可以加速测量、提高效率（填充不要超过半杯，过满的样品有可能污染传感器）。

2. 测量

（1）把样品室螺旋打到 OPEN/LOAD 位置并打开样品室。

（2）放入样品。检查杯子的边缘，确定没有样品残留。

（3）小心关闭样品室，尤其是液体样品。

（4）按右下角按钮，观察样品与样品室间温度差异。

（5）把样品室螺旋打到 READ 位置，密封样品室。仪器出现哔哔声一次，并且绿色灯闪烁一次，表明开始测量循环。

【注意事项】

1. 样品水势不同，所需平衡时间不同，样品水势越低，所需平衡时间越长。如正常供水的小麦旗叶水势为-3.2×10^5Pa，平衡时间 10min即可；而严重干旱的小麦叶水势为-22.7×10^5Pa，平衡时间需 2h以上。平衡时间过短，不能测出正确结果；平衡时间太长，也会造成实验误差。

2. 一般认为从叶圆片边缘的水分散失和离体期间的淀粉水解中会造成测定的一定误差，但只要合理取样并迅速将叶圆片密封到样品室中，可把误差减少到最小。

【思考与作业】

1. 测定植物叶片水势的两大类方法各有哪些主要优缺点?

2. 如何理解叶片水势越低，所需平衡时间越长?

实验 21　小麦幼苗吐水现象的观察

【实验目的】

理解植物吐水现象和水分代谢的关系。

【实验原理】

根系发育良好的健康植株，当它处于空气湿度饱和的条件下，蒸腾作用受到阻碍，为了维持植物体内的水分平衡，植物通过叶片尖端的吐水器，以液滴的方式散失水分，这就是吐水现象。吐水是植物根系活动的结果，若改变土壤的环境条件，根系的正常活动受到阻碍，吐水现象就会受到抑制或停止。

【实验材料】

培养 5~7 天的小麦幼苗。

【器材和试剂】

1. 器材

温度计、滤纸、棉花、玻璃棒、烧杯、培养皿。

2. 试剂

10%NaCl 溶液、乙醚或氯仿。

【实验内容与步骤】

（1）在实验前 5~7 天把小麦种子放在盛有 5~10mL 水的 150mL 的烧杯内，盖上培养皿。在 25℃左右的条件下萌发并培养，取生长良好的幼苗，每组培养 2 份。

（2）取一份培养的植物材料，选择 2~3 株小麦幼苗，用粘在玻璃棒上的滤纸，吸掉叶片尖端的水珠，观察并记录每次水珠重新出现所需的时间，这样重复 3~4 次，得出在室温条件下吐水的平均速度。

（3）将烧杯放置在有冰的浅水浴中，测量浅水浴的水温，并观察和记录吐水的速度。

（4）再将烧杯放在 37~40℃的温水浴内，观察吐水的平均速度，比较根系环境的温度变化对吐水的影响。

（5）另取一份盛小麦幼苗的烧杯，注入 10mL 10%NaCl 溶液，改变根际环境的渗透势，并记录观察到的现象。

（6）再另取一份盛有小麦幼苗的烧杯，观察吐水速度，随后在烧杯内投入一小团蘸有乙醚（或氯仿）的棉花球，观察并记录吐水速度。

【思考与作业】

1. 对实验结果及观察到的现象给予解释。
2. 解释产生吐水现象的动力是什么?
3. 实验材料为什么要选择生长良好的?

实验 22　植物体内硝酸还原酶活力的测定

【实验目的】

掌握硝酸还原酶活性测定的两种方法，加深对硝酸还原酶在植物体氮素代谢中作用的理解。

【实验原理】

硝酸还原酶（NR）是植物氮素同化的关键酶，它催化植物体内的硝酸盐还原为亚硝酸盐：$NO_3^- + NADH + H^+ \xrightarrow{NR} NO_2^- + NAD^+ + H_2O$，产生的亚硝酸盐与对氨基苯磺酸（或对氨基苯磺酰胺）及α-萘胺（或萘基乙烯胺）在酸性条件下定量生成红色偶氮化合物。

生成的红色偶氮化合物在 540nm 有最大吸收峰，可用分光光度法测定。硝酸还原酶活性可由产生的亚硝态氮的量表示。一般以单位时间内每克鲜重含氮量表示，即以μg/（g·h）为单位。NR 的测定可分为活体法和离体法。活体法步骤简单，适合快速、多组测定；离体法复杂，但重复性较好。

Ⅰ 离 体 法

【实验材料】

新鲜小麦叶片（取样宜在晴天进行，最好提前 2 天施用一定量的硝态氮肥，取样部位应一致）。

【器材和试剂】

1. 器材

冷冻离心机、分光光度计、天平（0.1mg）、冰箱、恒温水浴、研钵、剪刀、离心管、具塞试管（10mL）、移液管（5mL、2mL、1mL）、吸耳球。

2. 试剂

（1）亚硝酸钠标准溶液：准确称取分析纯$NaNO_2$ 0.9857g，溶于去离子水后定容至 1000mL，然后再吸取 5mL定容至 1000mL，即为 1μg/mL亚硝态氮的标准液；

（2）0.1mol/L pH7.5 的磷酸缓冲液：$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 30.0905g与$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 2.4965g加去离子水溶解后定容至 1000mL；

（3）1%（*m/V*）对氨基苯磺酸溶液：1.0g 对氨基苯磺酸溶于 100mL 3mol/L HCl 中（25mL 浓盐酸加水定容至 100mL，即为 3mol/L HCl）；

（4）0.2%（*m/V*）萘基乙烯胺溶液：0.2g萘基乙烯胺溶于 100mL 3mol/L HCl中，贮于棕色瓶中；

（5）0.1mol/L KNO_3溶液：2.5275g KNO_3溶于 250mL 0.1mol/L pH7.5 的磷酸缓冲液中；

（6）0.025mol/L pH7.8 的磷酸缓冲液：8.8640g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$，0.0570g $KH_2PO_4 \cdot 3H_2O$溶于 1000mL去离子水中；

（7）提取缓冲液：0.121g半胱氨酸，0.0372g EDTA溶于 100mL 0.025mol/L pH7.8 的磷酸缓冲液中；

（8）2mg/mL的NADH溶液：2mg NADH溶于 1mL 0.1mol/L pH7.5 磷酸缓冲液中（临用前配制，低温保存）。

【实验内容与步骤】

1. 标准曲线制作

取 7 支洁净烘干的 15mL 刻度试管按表 22-1 顺序加入试剂，配成 0~2.0μg 的系列标

准亚硝态氮溶液。摇匀后在 25℃下保温 30min，然后在 540nm 下比色测定。以亚硝态氮浓度（μg/mL）为横坐标（x），吸光值为纵坐标（y）建立回归方程。

表 22-1　0~2.0μg 的系列标准亚硝态氮溶液配制表

管号	1	2	3	4	5	6	7
亚硝酸钠标准溶液/mL	0	0.2	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0
蒸馏水/mL	2	1.8	1.6	1.2	0.8	0.4	0
1%磺胺/mL	4	4	4	4	4	4	4
0.2%萘基乙烯胺/mL	4	4	4	4	4	4	4
每管亚硝态氮浓度/（μg/mL）	0	0.02	0.04	0.08	0.12	0.16	0.2

2. 样品中硝酸还原酶活力测定

（1）酶的提取：称取 1g 鲜样，于研钵中剪碎置低温冰箱冰冻 30min，取出置于冰浴中并加少量石英砂及 6mL 提取缓冲液，研磨成匀浆，转移入离心管中，在 4℃ 12 000r/min 离心 15min，上清液即为粗酶提取液。

（2）酶反应：取 3 个 10mL 试管，按照表 22-2 设计分别加入磷酸缓冲液和 NADH 溶液，及粗酶液等，混匀，在 25℃水浴中保温 30min。

表 22-2　酶反应体系配制表

反应底物 / 酶反应管	0.1mol/L KNO_3 磷酸缓冲液/mL	NADH 溶液/mL	0.1mol/L pH7.5 磷酸缓冲液/mL	粗酶液 /mL
对照 1	1.6	0	0.2	0.4
对照 2	0	0.2	1.6	0.4
反应组 1	1.6	0.2	0	0.4

（3）终止反应和比色测定：保温结束后立即加入 1mL 磺胺溶液终止酶反应，再加 1mL 萘基乙烯胺溶液，显色 30min 后于 4000r/min 离心 5min，取上清液在 540nm 下比色测定。根据标准曲线计算出反应液中所产生的亚硝态氮总量（μg）。

3. 结果计算

样品中酶活性

$$[\mu g/(g\cdot h)]=\frac{X\times V_3/V_2\times V_1}{W\times t} \tag{22-1}$$

式中，X：反应液酶催化产生的亚硝态氮总量（μg）；V_1：提取酶时加入的缓冲液体积（mL）；V_2：酶反应时加入的粗酶液体积（mL）；V_3：与磺胺等发生颜色反应的总体积（mL）；W：样品重量（g）；t：反应时间（h）。

Ⅱ 活 体 法

【实验材料】

新鲜蜀葵叶片。

【器材和试剂】

1. 器材

真空抽气泵、抽气用真空干燥器、50mL 三角瓶、玻璃瓶塞（其他器材同离体法）。

2. 试剂

亚硝酸钠标准液、0.1mol/L KNO_3、1%磺胺、0.2%萘基乙烯胺（配制方法同离体法）1%三氯乙酸溶液（1g三氯乙酸，水溶后定容至 100mL）。

【实验内容与步骤】

1. 标准曲线制作

同离体法。

2. 酶反应及活性测定

（1）取样：称取作物叶片 1.0~2.0g 共 4 份，剪成 1cm 左右的小段，放于 4 个三角瓶中，其中 1 份作对照，另外 3 份作酶活性测定用。

（2）反应：先向对照三角瓶中加入 1mL 1%三氯乙酸溶液，然后在每个三角瓶中都加入 9mL 0.1mol/L KNO_3溶液，混匀后立即放入干燥器中，抽气 1min后通入空气，再抽真空，反复几次，以排除组织间隙的气体，至叶片完全沉入瓶底，以便底物溶液进入组织。最后通入氮气密封后，在 25℃黑暗中反应 0.5h，分别向测定瓶（对照瓶除外）加入 1mL 1%三氯乙酸终止酶反应。

（3）比色测定：将各瓶摇匀静置 2min 后，各取 2mL 反应液，加入 1mL 磺胺和 1mL 萘基乙烯胺，摇匀显色 15min 后，于 4000r/min 离心 5min，取上清液于 540nm 的波长处测其吸光值。结果计算同离体法。

【注意事项】

1. 硝酸还原酶容易失活，离体法测定时，操作应迅速，并且在 4℃下进行。

2. 硝酸盐还原过程应在黑暗中进行，以防亚硝酸盐还原为氨。

3. 制作标准曲线和酶反应后，从显色到比色时间尽可能要一致，显色时间过长或过短对颜色都有影响。

4. 磺胺和萘基乙烯胺溶液加入顺序不能颠倒。

【思考与作业】

1. 测定硝酸还原酶的材料为什么要提前一天施用一定量的硝态氮肥，并且取样应在晴天进行?

2. 比色测定时加入磺胺和萘基乙烯胺的前后顺序不能颠倒的原因是什么?

实验 23　光合作用的 Hill 反应

【实验目的】

掌握 Hill 反应的原理，理解叶绿体的还原能力对光合作用正常运转的重要性。

【实验原理】

英国生物学家 R.Hill 在 1937 年发现，离体叶绿体加到具有适当氢接受体（A）溶液中，

光照后放出氧气。



$$2H_2O + 2A \xrightarrow[\text{叶绿体}]{\text{光}} 2AH_2 + O_2 \tag{23-1}$$

实验中用的氧化剂A是 2,6-二氯靛酚（简称 2,6-D），是一种蓝色染料，接受电子和H^+后被还原成无色。在一定的反应系统中，有光的情况下，叶绿体将 2,6-D还原，从蓝色到无色。通过测定其光密度的变化，可以表示叶绿体的还原能力。

【实验材料】

菠菜叶。

【器材和试剂】

1. 器材

研钵、移液管、离心机、722 型分光光度计、500W 灯泡。

2. 试剂

（1）提取液（0.02mol/L Tris-HCl 缓冲液，含有 0.4mol/L 蔗糖，0.03mol/L KCl，pH7.5）。

（2）DCMU（用 0.02mol/L Tris-HCl 缓冲液配制成 5μmol/L DCMU 溶液）。

（3）2,6-D（用 0.02mol/L Tris-HCl 缓冲液配制成 0.003% 2,6-D 溶液）。

（4）蔗糖等。

【实验内容与步骤】

（1）取 5g 新鲜菠菜叶，洗净擦干，去掉中脉剪碎放入冰浴里的研钵中，加入 5mL 预冷的提取液，迅速研磨破坏细胞，再加 5mL 预冷的提取液混匀。悬浮液经 4 层纱布过滤后，将滤液装入离心管中，1000r/min 离心 3min，弃去沉淀（未破碎细胞及残渣），上清液于 3000r/min 离心 5min，弃去上清液，将沉淀用预冷的 5mL 提取液悬浮，即为叶绿体悬浮液。

（2）取 0.1mL 叶绿体悬浮液加入 7mL 的离心管中，再加入 4.9mL 80%（*V*/*V*）丙酮，混匀后在 652nm 测光密度，计算出叶绿素的含量。

$$C(mg/mL) = OD_{652} \times \frac{1}{34.5} \times \text{稀释倍数} \tag{23-2}$$

（3）用预先冷冻的提取液稀释叶绿体悬浮液，总体积为 10mL 即可，使叶绿体悬浮液浓度大约相当于叶绿素浓度（0.04mg/mL）。

（4）取 9 支试管，编好号码并用黑纸包住避光，照表 23-1 把提取液、DCMU、2,6-D 加入各试管中，于 600nm 处读取 1 号管光密度，分别取 0.5mL 和 1mL 叶绿体悬浮液放入 2 号和 3 号试管中，立即于 600nm 处读取光密度，再按表中要求加入叶绿体悬浮液于其他试管中，然后把黑纸剥掉，将 4 号、6 号和 8 号管置于距光源 20cm 处，把 5 号、7 号和 9 号管放在距光源 60cm 处（注意：试管和灯之间放一个盛满水的玻璃器皿），10min 后，立即用黑纸把试管包好放冰浴中，然后于 600nm 处分别读取光密度。

表 23-1　各试管反应体系配制表

试管号	提取液/mL	叶绿体/mL	DCMU/mL	2.6-D/mL
1	4.0	—	—	1.0
2	4.5	0.5	—	—
3	4.0	1.0	—	—
4 和 5	3.5	0.5	—	1.0
6 和 7	3.0	1.0	—	1.0
8 和 9	—	1.0	3.0	1.0

【注意事项】

1. 提取叶绿体时：

（1）在低温（冰浴）条件下进行操作；

（2）离心管需相互配平后才能离心；

（3）在两次离心时，第一次留上清液，第二次弃上清液；

（4）将沉淀悬浮均匀（用移液管吹）后，放在冰浴中保存，待实验结束后方能弃掉。

2. 加样过程中：

（1）不同反应管一定要做好标记；

（2）Hill 反应时加的不是丙酮稀释液，而是用提取液稀释叶绿体悬浮液。

【思考与作业】

1. 叶绿体浓度和光照强度对 Hill 反应有何影响？为什么？

2. DCMU 对 Hill 反应的抑制机理何在？

实验 24　核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶活性的测定

【实验目的】

学习 RuBPCase 的酶活性测定方法，加深对 RuBPCase 重要性的认识。

【实验原理】

核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶（ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase，RuBPCase）是光合作用碳代谢中的重要调节酶，是植物中最丰富的蛋白质，主要存在于叶绿体的可溶部分，总量约占叶绿体可溶蛋白的 50%~60%。本实验采用分光光度法测定酶的羧化能力。

在RuBPCase的催化下，1 分子的核酮糖-1,5-二磷酸（RuBP）与 1 分子的CO_2结合，产生 2 分子的 3-磷酸甘油酸（PGA），PGA可通过外加的 3-磷酸甘油酸激酶和甘油醛-3-磷酸脱氢酶的作用，产生甘油醛-3-磷酸，并使还原型辅酶Ⅰ（NADH）氧化，反应如下：



$$RuBP + CO_2 + H_2O \xrightarrow{RuBPCase} 2PGA \tag{24-1}$$



$$PGA + ATP \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{甘油酸-1,3-二磷酸} + ADP \tag{24-2}$$



$$\text{甘油酸-1,3-二磷酸} + NADH + H^+ \longrightarrow \text{甘油醛-3-磷酸} + NADP^+ + Pi \tag{24-3}$$

如果 1 分子CO_2被固定，则有 2 分子还原型辅酶 I 被氧化。因此，由辅酶氧化的量就可计算RuBPCase的活性，由 340nm吸光度的变化可计算还原型辅酶 I 氧化的量。这样就可以用紫外分光光度法来计算酶活力。

为了使NADH的氧化与CO_2的固定同步，从而需要加入磷酸肌酸（Cr-P）和磷酸肌酸激酶的ATP再生系统。



$$ADP+Cr-P \xrightleftharpoons{\text{磷酸肌酸激酶}} ATP+Cr \quad (24-4)$$

【实验材料】

菠菜叶片、小麦及水稻叶片。

【器材和试剂】

1. 器材

紫外分光光度计、冷冻离心机、匀浆器、移液管、秒表。

2. 试剂

（1）RuBPCase提取介质：40mmol/L（pH 7.6）Tris-HCl缓冲溶液，内含 10mmol/L $MgCl_2$、0.25mmol/L EDTA、5mmol/L谷胱甘肽。

（2）反应介质：100mmol/L Tris-HCl缓冲液，内含12mmol/L$MgCl_2$和0.4mmol/L EDTA-Na_2，pH 7.8。

（3）5mmol/L NADH、25mmol/L RuBP、0.2mol/L $NaHCO_3$、160U/mL磷酸肌酸激酶溶液、160U/mL甘油醛-3-磷酸脱氢酶溶液、50mmol/L ATP、50mmol/L磷酸肌酸、160U/ mL磷酸甘油酸激酶溶液、菠菜的RuBPCase提取液。

【实验内容与步骤】

1. 酶粗提液的制备

取新鲜菠菜叶片 10g，洗净擦干，放匀浆器中，加 10mL 预冷的提取介质，高速匀浆 30s，交替进行 3 次；匀浆经 4 层纱布过滤，滤液于 20 000g 4℃下离心 15min，弃沉淀；上清液即酶粗提液，置 0℃保存备用。

2. RuBPCase 活力测定

按表 24-1 配制酶反应体系。

表 24-1 各溶剂含量及配制

试剂	加入量/mL	试剂	加入量/mL
5mmol/L NADH	0.2	反应介质	1.4
50mmol/L ATP	0.2	160U/mL 磷酸肌酸激酶	0.1
酶提取液	0.1	160U/mL 磷酸甘油酸激酶	0.1
50mmol/L Cr-P	0.2	160U/mL 磷酸甘油醛脱氢酶	0.1
0.2mol/L $NaHCO_3$	0.2	蒸馏水	0.3

将配制好的反应体系摇匀，倒入比色杯内，以蒸馏水为空白，在紫外分光光度计上 340nm 处测定， 反应体系的吸光度作为零点值。将 0.1mL RuBP 加于比色杯内，并马上

计时，每隔 30s 测一次吸光度，共测 3min。以零点到第一分钟内吸光度下降的绝对值计算酶活力。

由于酶提取液中可能存在 PGA，会使酶活力测定产生误差，因此除上述测定外，还需做一个不加 RuBP 的对照。对照的反应体系与上述酶反应体系完全相同，不同之处只是最后加入酶提取液，加入后马上测定此反应体系在 340nm 处的吸光度，并记录前一分钟内吸光度的变化量，计算酶活力时应减去这一变化量。

3. 结果计算

$$\text{RuBPCase的酶活力}=\frac{\Delta A\cdot N\cdot 10}{6.22\times 2\mathrm{d}\Delta t}[\mu\mathrm{mol}/(\mathrm{ml}\cdot\mathrm{min})] \tag{24-5}$$

式中，ΔA：反应最初 1min内 340nm处吸光度变化的绝对值（减去对照液最初 1min的变化量）；N：稀释倍数；6.22：每微摩尔NADH在 340nm处的吸光系数；2：每固定 1mol CO_2 有 2mol NADH被氧化；Δt：测定时间 1min；d为比色光程（cm）。

【注意事项】

1. RuBP 很不稳定，特别是在碱性环境下，因而使用有效期不超过 2~4 周，且应在 pH5~6.5 之间以 10mmol/L 保存于−20℃。

2. 三磷酸甘油酸激酶和三磷酸甘油醛脱氢酶可从 Sigma 等公司购买，也可按 Scopes（1969）方法从兔子肌肉中提取。

【思考与作业】

1. 试述 RuBPCase 在光合作用中的生物学意义?
2. 为什么加入ATP再生系统就可使NADH氧化与CO_2的固定同步?
3. 假若提高反应体系中氧气浓度，该酶的活性会发生吗？为什么?

实验 25　乙醇酸氧化酶活性的测定

【实验目的】

1. 了解光呼吸途径与碳素循环及卡尔文循环的关系。
2. 掌握乙醇酸氧化酶活性测定的原理和方法。

【实验原理】

乙醇酸氧化酶（glycolic acid oxidase）是以黄素单核苷酸（FMN）为辅基的氧化酶，它催化乙醇酸氧化生成乙醛酸。乙醇酸氧化酶是植物光呼吸中一个有代表性的酶。核酮糖-1,5-二磷酸（RuBP）在核酮糖-1,5-二磷酸加氧酶（rubisco）的作用下，生成一个三碳化合物和一个磷酸乙醇酸，后者脱磷后，就生成乙醇酸，即植物光呼吸的底物。乙醇酸在叶绿体中产生，在过氧化体内被乙醇酸氧化酶氧化为乙醛酸，最后在线粒体中放出 1 分子CO_2。

本实验用菠菜叶片为材料提取乙醇酸氧化酶。乙醇酸氧化酶催化乙醇酸氧化成乙醛酸，生成的乙醛酸与苯肼反应生成苯腙。苯腙在 324nm 处有强烈吸收，用紫外分光光度计测定样品在 324nm 处吸光度的变化，可计算出苯腙生成的量。氧化 1 分子乙醇酸就有

1 分子苯腙形成。可根据生成苯腙的量计算乙醇酸氧化酶的酶活力。

【实验材料】

菠菜叶片、小麦叶片、玉米叶片。

【器材和试剂】

1. 器材

紫外分光光度计、冷冻离心机、匀浆器、试管等。

2. 试剂

（1）50mmol/L 盐酸苯肼溶液，用 1mmol/L NaOH 调至 pH 6.0。

（2）100mmol/L（pH7.5）磷酸缓冲液。

（3）50mmol/L CH_3COONa（乙醇酸钠）溶液。

（4）提取介质：40mmol/L（pH7.6）Tris-HCl缓冲溶液内含 10mmol/L $MgCl_2$、0.25mmol/L EDTA、5mmol/L 谷胱甘肽。

（5） 固体硫酸铵。

【实验内容与步骤】

1. 酶液的制备

取新鲜菠菜叶片 30g，加入 60mL 预冷的提取介质，在匀浆器中高速匀浆 2 次，每次 30s；匀浆经 4 层纱布过滤，滤液于 2℃ 1000*g* 离心 10min，弃沉淀；把固体硫酸铵粉末按 100mL 溶液加 11g 的比例加入上清液中，边加边搅拌，使溶液达 20%的饱和度，待硫酸铵完全溶解后，于 2℃ 2000*g* 离心 20min，弃沉淀；再以 100mL 溶液加 6g 的比例向上清液中加入硫酸铵，溶液达 30%的饱和度，再于 2℃ 2000*g* 离心 20min，沉淀用 100mmol/L（pH 7.5）磷酸缓冲液溶解，置 4℃冰箱内备用。

2. 酶活性的测定

在 1cm 光程的石英比色杯内加入 0.3mL 50mmol/L 盐酸苯肼，2.5mL 100mmol/L（pH 7.5）磷酸缓冲液，0.1mL 酶提取液，摇匀后在紫外分光光度计上于 324nm 处测定吸光度，作为反应的零点值。吸取 0.1mL 50mmol/L 乙醇酸钠溶液加入比色杯，立即计时，每 30s 测定一次吸光度，共测 3min。从第一分钟内吸光度的变化值计算酶活力。

3. 结果计算

按下式计算乙醇酸氧化酶的酶活力：

$$\text{酶活力}=\frac{\Delta A\times N\times 10}{17.0\times \mathrm{d}\times \Delta t} \tag{25-1}$$

式中，ΔA：反应开始后最初 1min 内 324nm 处吸光度的变化值；N：稀释倍数；17.0：苯腙在 324nm 处的吸光系数[mL/（μmol · cm）]；d：比色杯光程（cm）；Δt：本实验反应时间，是 1min；酶活力单位为单位时间、单位酶液中所含乙醇酸的微摩尔数[μmol/（mL · min）]。

【注意事项】

严格按照要求将硫酸铵加入提取液中，而且注意一边加一边搅拌，达到要求的饱和度。

【思考与作业】

1. 测定乙醇酸氧化酶活性有何意义？

2. 光呼吸与植物光合作用有何关系？

实验 26　植物光合与呼吸速率的测定——氧电极法

【实验目的】

理解氧电极法测定光合和呼吸速率的机理，掌握氧电极法的测定方法。

【实验原理】

用薄膜氧电极与其配套装置测定溶液中的氧浓度，具有灵敏度高、反应迅速、操作方便和取样量少等优点。它不仅可以测定反应体系的吸氧与耗氧的数量，还可以追踪氧浓度变化的动态过程，并能用于研究某些试剂与环境条件对体系放氧或耗氧的影响。因此，在生物研究中被广泛应用。例如在光合作用研究中，用其测定叶片、细胞、叶绿体的光合放氧、破碎叶绿体的Hill反应以及PSⅠ与PSⅡ的活性。在呼吸作用研究中，用其测定生物组织、微生物、原生质体和线粒体等的耗氧速率。在生化研究中，可用于测定某些酶的活性，例如，Rubisco的加氧反应速率，过氧化氢酶分解H_2O_2的放氧反应速率等，尤其更多地被应用于光合与呼吸的控制研究中。总之，凡是生物体以及活性物质的耗氧或放氧反应，几乎都可以用氧电极测定，本实验学习氧电极的测氧原理、测氧装置的操作技术、测定叶碎片的光合速率与呼吸速率的方法，以及观察电子传递抑制剂对光合放氧的抑制现象。

测定溶解氧的原理：氧电极是测定溶液中含氧量的一种极谱电极。它由两个电极组成。一个是铂电极，作为阴极；另一个是银电极，作为阳极。铂电极面积小，而银电极面积较大，两极都浸在KCl电解质溶液中。氧电极表面覆盖能透过氧分子的薄膜，依此与测定溶液隔开。测定溶解氧是利用氧在阴极上首先被还原的特性。当两个电极之间未加极化电压时，回路里几乎没有电流通过；当外加一个直流电压为氧的极化电压（0.7V）时，则氧分子在铂阴极上得到电子，O_2被还原：



$$O_2 + 2H_2O + 4e^- = 4OH^- \qquad (26\text{-}1)$$

在阳极上，发生银的氧化反应：



$$4Ag^+ + 4Cl^- = 4AgCl + 4e^- \qquad (26\text{-}2)$$

接通电路后，在阳极上产生的电子流向阴极，回路中就有电流。在回路中加一个电阻，电阻两端就有电压，并可引线输出。

电极上的氧化还原速度很快，电流的大小决定于氧通过薄膜向阴极表面的扩散速度，而扩散速度主要受溶液中氧浓度的影响。因此，氧在还原时所引起的扩散电流与扩散到阴极上氧的浓度成正比，即

$$i=\frac{\mathrm{AD}}{\mathrm{L}}nFC \qquad (26\text{-}3)$$

式中，i：扩散电流（μA）；A：电极面积（cm^2）；D：扩散系数（与温度有关）（cm^2/s）；L：扩散层厚度（与薄膜厚度及体系是否搅拌有关）（cm^2）；F：法拉第常数（C/mol）；n：参加电极反应的电子数；C：试样中氧的浓度mmol/L。

由上式可见，扩散电流的大小与电极面积、氧浓度成正比，而与扩散层厚度成反比。就某一电极而言，A、L、F 为常数（K=AF/L），那么，i=KDnC。当极化电压及温度恒定时，D、n 也可视为常数。因此，根据扩散电流或输出电压的大小即可测定溶液中氧的浓度。

叶碎片光合与呼吸测定原理：离体的叶碎片在水溶液中能进行呼吸作用，如供给CO_2底物并给予光照，叶碎片便进行光合作用。呼吸的耗氧量与光合的放氧量能被氧电极测氧装置测定。由于测定的叶片浸在水溶液中，气孔在此条件下通常是张开的，这就免除了气孔开度变化的干扰。要测试一些药物对光合或呼吸作用的影响，只要把药物注入反应液中即可。处理非常方便，结果十分直观。

【实验材料】

植物叶片。

【器材和试剂】

1. 器材

测氧装置 1 套[包括氧电极、氧电极控制盒（带有电磁搅拌器）、反应杯、光源等、电脑]、30mL 针筒、剪刀、0.1mL 微量进样器、双面刀片、遮光用的黑布、厘米尺等。

2. 试剂

测定介质（pH7.5 的 0.1mol/L $NaHCO_3$的水溶液）、半饱和的氯化钾溶液、5mmol/L DCMU（称取 23.2mg DCMU溶于 20mL甲醇中）、无水亚硫酸钠（除氧剂）。

【实验内容与步骤】

1. 氧电极仪的安装和调试

具体操作参照仪器使用说明书。

2. 植物的光合速率与呼吸速率的测定

（1）材料准备：取小麦、水稻等植物叶片，用双面刀片划取一定面积（按每毫升反应体积需 0.5cm^2叶碎片取样）。将叶块放入盛有测定介质的大针筒中，进行手工真空渗入，排除叶内气体，使叶块下沉。然后将下沉的叶块取出，用眼科手术剪刀剪成面积约为 1~2mm^2的碎片，放入盛有测定介质的离心管中（也可将叶块不经真空渗入，直接剪碎后放入盛有少量测定介质的离心管中备用）。

（2）呼吸测定：把下沉叶碎片连同测定介质一起倒入反应杯，盖上反应杯塞，多余介质溢出（对不进行真空渗入的叶碎片，在放入反应杯后，先盖盖子，然后从注液孔中补充反应介质）。开启电磁搅拌器，显示器给出测定曲线。

（3）光合测定：打开光源，给反应杯照光。因光合滞后期的缘故，叶片在照光初期仍处于耗氧状态，需过 1~3min 后才由耗氧转为放氧，待线走直，再记录 2~3min。

（4）光合抑制：待光合放氧处于稳态时，用微量进样器向反应杯注入 10μL 5mmol/L DCMU，中止反应。约 2min后，停止记录。用真空泵抽吸除去废液，用蒸馏水反复冲洗反应杯。测定完毕时，将反应杯中水吸干，并盖上反应杯盖子，测定下一个样品。

（5）用仪器自带的 Windows 计算软件来计算光合和呼吸速率。

【注意事项】

1. 氧电极对温度变化很敏感，故测定时需恒定反应体系的温度。

2. 电极在使用过程中会发生污染，电解液浓度也会逐渐改变，使灵敏度下降。因此每次使用前，需用专用清洗剂擦洗电极，重新安装电极膜。

3. 单独测定呼吸速率时，测定介质中可不必加$NaHCO_3$。

4. 室内培养的材料，应该预先用强光照射，以促使气孔打开。

5. 氧电极测定光合速率的数值通常较空气中低，必要时设法校正。

6. 应注意避免反应杯内存在气泡，或叶片切得过大，或搅拌速率不匀，因为这些因素都会使记录曲线扭曲。

【思考与作业】

1. 测定过程中，为何要不断搅拌溶液，以及维持反应体系的温度恒定？

2. 为什么要将测定体系中气泡排除？

3. 哪些因素会影响光合放氧的测定结果？

实验 27　油类种子萌发时的脂肪转变成糖的观察

【实验目的】

巩固对种子结构的认识，掌握脂肪转变成糖的过程。

【实验原理】

油类种子在萌发过程中，将储存于胚乳内的脂肪变成糖，供幼苗生长发育使用。本实验用花生种子为材料，在花生种子外面，红色或红紫色的部分即为种皮。种皮内的胚由胚芽、胚根、胚轴和两片子叶组成。子叶肥厚、乳白色，而且有光泽，其细胞内含有丰富的营养物质，特别是脂肪。实验时先确定储藏物质的成分，再观察萌发后脂肪变成糖的过程。

【实验材料】

萌发和未萌发的花生种子。

【器材和试剂】

1. 器材

显微镜、载玻片和盖玻片、刀片、电热板、镊子。

2. 试剂

（1）苏丹Ⅲ试剂：0.1g 苏丹Ⅲ先用 95%酒精 10mL 溶解，再加 10mL 甘油混匀即可。

（2）米伦试剂：40g汞溶于 60mL密度为 1.42g/cm^3的浓硝酸中，水浴加热助溶后，用2 倍体积的蒸馏水稀释，待澄清后，取上清液使用。

（3） 费林试剂：使用时将A和B同等体积混合即可，A：50mL水+10.32g NaOH+346g酒石酸钾钠，用水稀释成 100mL；B：6.93g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$溶于 50mL水中，加水稀释成100mL。

（4）50%酒精。

（5）甘油。

（6）I-KI 溶液。

【实验内容与步骤】

1. 鉴定花生种子内储藏物质的成分

（1）小心剥去种皮，在水中浸泡一会，把种子各部分分别用刀片切成薄片，置于载玻片上，用下列试剂确定储藏物质的成分。

（2）取切片，滴加一滴 I-KI 溶液，然后用水洗净，观察有无蓝色出现，试验有无淀粉的存在，为什么？

（3）取切片滴加几滴苏丹Ⅲ试剂，染色 10min，再用 50%酒精洗净（注意节约酒精），用少许甘油将切片固定，盖上盖片，在显微镜下观察，如有脂肪存在，则可见红色油滴（或小的发亮的无色油滴）。

（4）在载玻片上滴一滴新配的米伦试剂，浸入切片，并小心地在水浴中加热，呈红色则证明有蛋白质沉淀。

2. 取萌发数天的花生种子的胚芽、胚轴、子叶，分别用刀片切片。放在载玻片上，分别用下列试剂检测淀粉及脂肪的存在。

（1）用 I-KI 溶液检测有无淀粉的存在。

（2）用苏丹Ⅲ检测脂肪。

3. 还原糖的鉴定

分别取萌发和未萌发的花生种子各一粒，去壳，于研钵中加入少许水研成匀浆状，再加 20mL 水搅拌均匀，倒入烧杯中加热煮沸，冷却后过滤，各取 5mL 分别放于两支试管中，加 1mL 费林试剂，水上煮沸 1min，比较两者的颜色变化。

【注意事项】

在用不同的试剂验证不同有机物的存在时，做好标记，以免混淆。

【思考与作业】

1. 油类种子萌发过程中脂肪是如何转变成糖的？
2. 油类种子萌发过程中呼吸商的大小有无变化，为什么？

实验 28　萌发小麦种子内α-淀粉酶活力的测定

【实验目的】

理解种子中两种淀粉酶的性质及活性测定的原理。

【实验原理】

淀粉酶几乎存在于所有植物中，尤其在谷物种子中活力最强。淀粉酶主要有两种：α-淀粉酶和β-淀粉酶。通过两种淀粉酶的联合作用，淀粉最终被水解为麦芽糖。休眠种子中β-淀粉酶活力较高，α-淀粉酶活力随种子萌发天数增加而增强，两种淀粉酶的特性也不相同，α-淀粉酶较耐热而不耐酸，在pH3.6 以下钝化；而β-淀粉酶较耐酸而不耐热，在 70℃保温 15min则丧失活力，但α-淀粉酶在此温度下却保持其活力。可利用这些特性的差异，分别测定两种淀粉酶的活力。本实验测定小麦种子在萌发前后α-淀粉酶的活力及最适pH。α-淀粉酶的活力以单位时间内产生的麦芽糖量计算，用 3,5-二硝基水杨酸法

测定还原糖的含量。

【实验材料】

未萌发和萌发 3 天的小麦种子的干粉。

【器材和试剂】

1. 器材

25mL 具塞刻度试管、恒温消毒两用水浴锅、25mL 试管及试管架、可见光分光光度计、移液管（1mL、2mL 和 10mL）、100mL 容量瓶。

2. 试剂

（1）2%可溶性淀粉溶液。

（2）1mg/mL 葡萄糖溶液。

（3）0.2mol/L Na_2HPO_4溶液。

（4）0.1mol/L 柠檬酸溶液。

（5）DNS（3,5-二硝基水杨酸）试剂（称取 0.63g 3,5-二硝基水杨酸，溶于 25mL 80% NaOH 溶液中，加入 50mL 25%酒石酸钾钠溶液，待溶解后，加入 0.5g 亚硫酸氢钠及 0.5g 重蒸苯酚，定容至 100mL，贮藏于棕色瓶，一周后使用）。

【实验内容与步骤】

1. α-淀粉酶的制备

称取未萌发和萌发 3 天的小麦种子磨成的干粉各两份，每份 1000mg，放入 20mL 试管中，加 10mL 40℃温水，于 40℃水浴中提取 1h，其间不断的搅动；保温结束后，过滤于 25mL 刻度试管中，并用 40℃温水淋洗滤渣，冷却后定容到 25mL 刻度处，于 70℃恒温水浴中保温 15min，以钝化β-淀粉酶，获得α-淀粉酶粗酶液，酶液储存于 4℃备用。

2. 葡萄糖标准曲线的制作

取 12 支 25mL 试管，分成两组，依次编号，向两组试管中依次加入 0mL、0.1 mL、0.2 mL、0.3 mL、0.4 mL、0.5mL 1mg/mL 葡萄糖溶液，并补水到 1mL。然后向每支试管内加入 2mL DNS 试剂，于沸水中煮沸 5min，取出后立即放入冷水中冷却。向每支试管内加入 7mL 蒸馏水，摇匀，以未加葡萄糖的处理作为对照，在分光光度计 520nm 处的光波测定样品反应液的吸光度。

3. 小麦种子萌发前后α-淀粉酶活力的测定

取 8 支 25mL 试管，分成甲、乙两组，依次编号。向两组试管内分别加入 2mL 未萌发和已萌发的小麦种子α-淀粉酶提取液，先将两组中的 1、2 号试管立即放入沸水浴中煮 15min，冷却到室温作为对照处理；然后向甲、乙两组的试管（包括对照）内分别加入 1mL 2%可溶性淀粉溶液，摇匀。于 37℃水浴中保温 20min。保温结束后，立即将甲、乙两组试管（包括对照）转入沸水浴中煮 15min，停止反应。

分别从各试管中取出 1mL 淀粉水解液，移入相应编号的空试管中，加 2mL DNS 试剂，沸水浴中反应 5min，冷却，加蒸馏水 7mL，以 1、2 号处理为对照，测定 520nm 光波下样品反应液的吸光度。

4. 小麦α-淀粉酶最适 pH 的测定

按照表 28-1 配制一系列不同 pH 的磷酸-柠檬酸缓冲液各 20mL，取 12 支 25mL 试管

分成两组，依次编号。向 1 号试管内加入 5mL pH5.6 的缓冲液，1mL α-淀粉酶提取液，立即煮沸 5min，然后再加入 1mL1%可溶性淀粉溶液，此处理作为零时对照；向 2~5 号试管内依次分别加入表中各种 pH 缓冲液 5mL、1mL 1%的可溶性淀粉、1mL 小麦种子α-淀粉酶提取液；于 37℃恒温水浴中反应 20min，然后转入沸水浴中加热 15min 终止水解反应。分别用移液管从每支试管内取出 1.0mL 反应液，按制作葡萄糖标准曲线的方法测定各管反应液的吸光度。

表 28-1　不同 pH 的磷酸-柠檬酸缓冲液

pH	0.2mol/L Na_2HPO_4/mL	0.1mol/L 柠檬酸/mL
3.6	6.44	13.56
4.6	9.35	10.65
5.6	11.60	8.40
6.6	14.55	5.54
7.6	18.73	1.27

5. 结果

（1）以葡萄糖浓度为横坐标，以其对应的吸光度值为纵坐标，绘制标准曲线。

（2）根据测得的样品吸光度值，从标准曲线上查出样品中葡萄糖含量。将葡萄糖的含量乘以 1.9 得麦芽糖的含量，然后计算每克小麦种子萌发前后α-淀粉酶的活力。α-淀粉酶活力单位定为 mg（麦芽糖）/ h（小麦干粉）。

$$\alpha\text{-淀粉酶的活力}=\frac{\text{样品麦芽糖含量(mg)}-\text{对照麦芽糖含量(mg)}}{\text{时间(h)}\cdot\text{小麦干粉重量(g)}}\times\text{稀释倍数}$$

（3）比较小麦种子萌发前后α-淀粉酶的活力，该结果说明了什么?

（4）计算各种 pH 下α-淀粉酶的活力，以酶活力为横坐标，其对应的 pH 为纵坐标，绘制酶活力与 pH 关系的曲线，分析该曲线的特点，求出α-淀粉酶的最适 pH。

【思考与作业】

1. α-淀粉酶和β-淀粉酶的理化性质和生理功能有何区别?
2. 小麦萌发前后α-淀粉酶活力变化的生物学意义何在?

实验 29　植物盐胁迫蛋白的检测

【实验目的】

1. 了解植物对逆境胁迫的适应机制。
2. 掌握 SDS-PAGE 凝胶电泳检测法分析可溶性蛋白质变化的测定原理和方法。

【实验原理】

植物体内的可溶性蛋白质种类和含量是一个重要的生理生化指标，而在植物遭受胁迫时会改变一些蛋白质的表达，其中在盐胁迫条件下新合成的或合成增加的蛋白质称为盐胁迫蛋白。通过提取可溶性蛋白质，采用 SDS-PAGE 凝胶电泳分离，考马斯亮蓝 R-250 染色法，就可检测出经胁迫后出现的蛋白质或含量增加的胁迫蛋白。

【实验材料】

高粱幼苗。将高粱种子浸泡 24h 后，播种在浮于水面的尼龙网上，室温萌动，待长出胚根后用 Hoagland 培养液于 26℃恒温，14h 光/10h 暗培养 5 天后取材处理。

【器材和试剂】

1. 器材

光照培养箱、冷冻离心机、恒温水浴振荡器垂直板凝胶电泳、电泳仪、真空泵、培养缸、微量注射器、尼龙膜、10mL 量筒、研钵。

2. 试剂

琼脂、甲叉双丙烯酰胺、丙烯酰胺（丙烯酰胺母液：丙烯酰胺 30g，甲叉双丙烯酰胺 0.8g溶于 100mL蒸馏水中，过滤后备用）、SDS、TEMED、过硫酸氨、提取缓冲液（75mmol/L磷酸缓冲液，pH7.8）、丙酮、上样缓冲液（含 62.5mmol/L的Tris-HCl pH6.8、2%SDS、10%甘油、5%巯基乙醇及 0.001%溴酚蓝）、电极缓冲液（3g Tris、14.4g甘氨酸、1g SDS溶于 800mL水，用HCl调pH至 8.3，加水定容至 1L）、考马斯亮蓝染色液（0.5g考马斯亮蓝R-250 溶于 90mL甲醇中，再加入 20mL冰醋酸和 90mL水，混匀）、脱色液（37.5mL冰醋酸，25mL甲醇，加水定容至 500mL）、标准蛋白分子质量Marker、Hoagland培养液的大量元素和微量元素的母液（大量元素母液浓度都是 1mol/L，有KH_2PO_4、KNO_3、$Ca(NO_3)_2$、$MgSO_4$，配制 1L时分别取 1mL、5 mL、5 mL、2mL；微量元素及母液浓度分别是 2.86g/L H_3BO_3，1.81g/L $MnCl \cdot 4H_2O$，0.22g/L $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$，0.08g/L$CuSO_4 \cdot 5H_2O$，0.02g/L $H_2MoO_4 \cdot H_2O$，配制 1L时各取 1mL）。

【实验内容与步骤】

1. 材料的处理：选取生长一致的 5 天龄高粱幼苗，洗净根部，分成两组，放入培养缸进行培养，对照组是 Hoagland 培养液，处理组是加有 200mmol/L NaCl 的 Hoagland 培养液。处理 48h。

2. 提取蛋白质：分别称取处理组和对照组的材料各 5g，放入预冷的研钵，剪碎，分 3 次加入 3mL 提取缓冲液充分研磨，收集匀浆液 15 000*g*，低温离心 20min，上清液用 4 倍体积的冷丙酮沉淀，以 8800*g* 低温离心 10min，所获沉淀用上样缓冲液悬浮后电泳。

3. 装好垂直板电泳槽：并且用热琼脂封好垂直板。根据表 29-1 配制浓缩胶和分离胶，先灌分离胶，且用正丁醇封上，待分离胶凝固后，吸干净正丁醇，再灌浓缩胶，插入梳子，静置半小时后，小心取出梳子，加入电泳缓冲液，准备上样。

表 29-1　分离胶和浓缩胶配制表

储液	11%分离胶	3%浓缩胶
丙烯酰胺母液	4.95mL	1.0mL
1.5mol/L Tris-HCl, pH8.9	3.375mL	—
0.5mol/L Tris-HCl，pH6.7	—	2.5mL
重蒸水	4.92mL	6.3mL
10% SDS	0.135mL	0.1mL
TEMED	6.75μL	15μL
10%过硫酸铵	108μL	75μL
总体积	13.5mL	10 mL

4. 加样：用微量注射器依次吸取样品 50μL 和标准蛋白分子质量 Marker 5μL，小心加入样品槽，对样品进行编号标记。

5. 电泳：接通电源，浓缩胶的电流控制在 10~15mA，当溴酚蓝指示剂进入分离胶时电流调整到 20mA，当指示剂前沿到达距离胶底 1cm 时，停止电泳。

6. 染色和脱色：取出胶后，平放在直径 15cm 的大培养皿中，水漂洗后用染色液 25℃ 下染色 6h 后：倒去染色液，在 25℃ 恒温水浴振荡器上进行脱色，其中需不断更换脱色液，直到背景清晰为止。取出凝胶照相。

7. 结果的分析：找到特异性条带，并对照分子质量 Marker，用凝胶成像系统分析特异性条带分子质量的大小。

【注意事项】

1. 制做分离胶和浓缩胶时，按表 29-1 的先后顺序配制，最后加入过硫酸铵和 TEMED，混匀后灌胶，避免产生气泡。

2. 考虑到不同叶片受盐胁迫的程度以及所作出的适应性反应可能不同，样品和对照可以分别加几个不同的上样量，以增加成功率。

【思考与作业】

经过盐胁迫处理后的高粱叶片的蛋白谱带与正常的相比，新增加的和含量增加的蛋白的相对分子质量各是多少？

实验 30　生长素促进生根的作用

【实验目的】

理解生长素促进生根的作用。

【实验原理】

用生长素处理离体茎时，生长素由于极性运输而迅速在茎基部积累，被活化的形成层细胞产生大量不定根。该原理被广泛应用在园艺生产上，就是用激素处理插枝，以促进生根。植株的生根现象是许多生物鉴定方法的生理基础，本实验用离体绿豆幼苗为材料，验证生长素促进生根的作用。

【实验材料】

绿豆幼苗。

【器材和试剂】

1. 器材：烧杯、黑纸、刀片。
2. 试剂：0.1mg/mL 的吲哚丁酸溶液。

【实验内容与步骤】

1. 材料培养：实验前 10 天，用 80℃热水浸种，自然降到室温后，继续浸泡 4h，将种子播入湿沙盘中，在 25℃温箱发芽，然后在光下培养。

2. 切段制备：挑选生长整齐，株高一致的幼苗，用刀片从子叶下 3cm 处切下根系，去除子叶，浸于水中备用。

3. 把 0.1mg/mL的吲哚丁酸溶液配制成浓度为 10^{-2}mg/mL、10^{-3}mg/mL、10^{-4}mg/mL、10^{-5}mg/mL、10^{-6}mg/mL的溶液。

4. 将绿豆切段放入盛有上列溶液与蒸馏水（对照）的杯子中，每杯 5 株，液面必须超过子叶节，用黑纸包住杯子，每隔 2 天观察记录一次，7 天后统计每个切段的生根情况，包括发根时间、出根条数、长短、粗细。

【注意事项】

1. 挑选生长整齐、高矮一致的幼苗进行生根培养。
2. 处理材料时液面必须超过子叶节。

实验 31　赤霉素打破马铃薯块茎的休眠、促进抽芽的作用

【实验目的】

理解赤霉素打破种子休眠，促进抽芽的作用，了解赤霉素在农业生产中的应用。

【实验原理】

赤霉素是一种植物激素，在低浓度下有促进植物生长、打破枝条或块茎的休眠、促进萌发与抽芽等效应。春播马铃薯夏收后，由于有一段休眠期，不能及时发芽，影响夏播。为了适时播种，可采用赤霉素溶液浸泡块茎的方法，促使块茎芽眼萌动，及早抽芽，为农业上二季栽培马铃薯提供种薯。

【实验材料】

新收获的马铃薯块茎。

【器材和试剂】

1. 器材

移液管、量筒、烧杯、刀子、台秤、大盘和河沙（或砂床）。

2. 试剂

赤霉素。

【实验内容与步骤】

1. 先配制 0.1mg/mL赤霉素母液：精确称取 20mg赤霉素结晶，用少量无水乙醇溶解后，再定容至 200mL蒸馏水中，即成 0.1mg/mL的母液，再从母液吸取释释成 5×10^{-4} mg/mL、10^{-3} mg/mL和 2.5×10^{-2}mg/mL三种浓度溶液各 500mL，分别盛于大烧杯中，贴好标签。

2. 从马铃薯块茎的芽眼处，用刀子把每一个芽眼切成一小块，共 150 块左右，混匀后，分成四组，每组 30 块，浸入配好的三种赤霉素溶液和蒸馏水（对照）中，浸 15~20min钟后取出芽眼小块，晾干。

3. 将浸过的芽眼小块分别种于温室的砂床中，芽眼向上，砂床上标记木牌，上面再覆盖一层湿润河沙，经常保持砂床湿润。

4. 一周以后，分别从砂床中取出芽眼小块，检查其发芽情况，并记录发芽情况与赤霉素浓度的关系表 31-1。

表 31-1　不同浓度的赤霉素与马铃薯块茎抽芽关系

赤霉素浓度/（mg/mL）	处理时间/天	处理温度/℃	抽芽情况		
			芽数	芽长/cm	芽重/g
0（对照） 5×10^{-4} 10^{-3} 2.5×10^{-2}					

【注意事项】

砂床始终保持湿润。

【思考与作业】

1. 赤霉素打破植物休眠的可能机理是什么？
2. 除本实验所用方法外，还有哪些打破土豆休眠的措施？

实验 32　赤霉素对α-淀粉酶的诱导作用

【实验目的】

理解赤霉素对α-淀粉酶诱导作用，认识α-淀粉酶在种子萌发过程中的重要作用。

【实验原理】

禾谷类种子的糊粉层是一种分泌组织，它包裹着种子的胚乳。当种子吸水后，糊粉层细胞受来自胚的赤霉素或外源的赤霉素的诱导，合成或激活许多水解酶类，促使胚乳或基质中的淀粉水解。如果把胚去掉，去胚种子不能或很少产生淀粉酶，所以淀粉的水解不能发生；如果把赤霉素施加到去胚的种子上，赤霉素能诱导淀粉酶的产生，促进淀粉的水解。

本实验是以去胚的小麦种子糊粉层为试验材料来研究赤霉素对α-淀粉酶的诱导作用。

【实验材料】

小麦种子。

【器材和试剂】

1. 器材

培养皿、刀片、镊子、滤纸、酒精灯。

2. 试剂

赤霉素、安替福民、可溶性淀粉、琼脂、I-KI 溶液。

【实验内容与步骤】

1. 选 20~30 粒大小均一的种子，用刀片横切两半，留无胚部分供实验用。

2. 培养基的制备：取可溶性淀粉 0.4g，加少量冷水调湿后，加水到 60mL，加热搅拌，直到透明为止，再加 0.6g 琼脂，继续加热煮沸，待充分溶解后，趁热将其倒入 2 个

培养皿中，并立即盖好培养皿盖，待凝固后备用。

3. 在酒精灯旁，将蘸有 0.2mg/mL 无菌赤霉素溶液的无菌滤纸圆片放在培养基表面，每个培养基上可放 4~5 片，另将蘸有无菌水的滤纸圆片同样贴于培养基上作对照用。

4. 将种子用 20%安替福民消毒 15~30min，用无菌水冲洗 3~4 次，放置在培养基的滤纸圆片上，盖上培养皿盖，于室温暗培养 40~48h。

5. 培养完毕后，用镊子小心除去麦粒和滤纸圆片，用 I-KI 溶液染色，观察淀粉被水解的情况，并对现象进行分析。

【注意事项】

1. 去胚小麦种子的无菌培养。
2. 将小麦的胚去彻底。

【思考与作业】

1. 实验中要求无菌操作的原因是什么？
2. 赤霉素对其他酶有无诱导作用？

实验 33　乙烯对果实的催熟作用

【实验目的】

巩固乙烯促进果实成熟的作用和作用机理的理解，认识乙烯利在果实催熟中的作用。

【实验原理】

乙烯是植物正常代谢的产物，是植物体内的一种内源气体激素，具有多种生理作用，其中一种非常重要的作用是能促进果实成熟。

乙烯利（2-氯乙基膦酸）是一种人工合成的植物激素。乙烯利在 pH 高于 4.1 时分解释放出乙烯，具有与乙烯相同的生理效应。而植物体内的 pH 一般高于 4.1，乙烯利溶液进入细胞后，缓慢分解释放出乙烯，可以发挥乙烯的调节作用。

【实验材料】

番茄、香蕉。

【器材和试剂】

1. 器材

层析缸、量筒、烧杯、容量瓶、移液管、塑料袋。

2. 试剂

乙烯利溶液。

【实验内容与步骤】

1. 摘取成熟度一致，果皮由绿转白的番茄 30 个，10 个一组分为三组。第一组和第二组分别浸泡在浓度为 0.5mg/mL 和 0.2mg/mL 乙烯利溶液中 1min，同时加入 0.1%的吐温-80 作表面活性剂；第三组浸于蒸馏水中 1min。

2. 将处理过的番茄分别放在 3 只层析缸中，加盖，或置于塑料袋中，缚紧袋口，置于 25~30℃阴暗处。逐日观察番茄变色和成熟过程，记下成熟的个数，直至全部番茄成熟为止。

【思考与作业】

1. 乙烯利在什么条件下可释放乙烯？

2. 乙烯对果实催熟的作用机理是什么？

3. 试比较乙烯利的催熟作用与处理浓度的关系。

实验 34　植物激素对植物形态建成的作用

【实验目的】

理解植物激素对植物形态建成作用的重要性，掌握生长素/激动素比率的变化是决定诱导根、芽和愈伤组织形成的关键因素。

【实验原理】

植物各器官的分化，首先是细胞的极化过程。植物体的每一个细胞都由受精卵分裂而来，即使高度分化的细胞也保留着遗传上的全能性，即在每一个细胞中包含着产生一个完整有机体的全部基因。早在 20 世纪 50 年代Skoog和崔澂就已发现在烟草组织培养中，激动素和生长素在愈伤组织产生和分化中的相互作用。愈伤组织的大量产生需要有生长素和激动素。当生长素/激动素的比例高时，诱导生根；当生长素/激动素的比例低时，诱导生芽；在两者的比例相当时，愈伤组织占优势。

本实验即以烟草髓组织的离体培养来观察生长素和激动素对植物形态建成的作用。

【实验材料】

40~60cm 高，生长健壮的烟草植株。

【器材和试剂】

1. 器材

烧杯、玻璃棒、容量瓶、量筒、移液管、三角瓶、培养皿、超净工作台、培养室、冰箱、天平、高压灭菌锅、镊子、手术刀、手术剪、酒精灯、滤纸、铝箔。

2. 试剂

（1） 琼脂、蔗糖、安替福民、70%乙醇。

（2） 各种母液

① NH_4NO_3	41.25g
② KNO_3	47.5g
③ $MgSO_4$	9.25g
④ $CaCl_2$	3.3g
⑤ K_2HPO_4	9.25g
⑥ $MnSO_4$	557.5mg
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	625mg

$ZnSO_4$	265mg
⑦ KI	20.75mg
H_3BO_3	155mg
$Na_2MOO_4 \cdot 2H_2O$	6.25mg
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.625mg
⑧ Na_2EDTA	932.6mg
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	695mg
⑨ B_1（盐酸硫胺素）	2.5mg
⑩ 肌醇	2.5g

以上试剂分别称取后，用水溶解，定容至 250mL，共配制 10 种不同母液。

⑪ 0.1mg/mL 的生长素溶液：精确称取 25mg IAA，用少量乙醇溶解后，用水稀释定容到 250mL。

⑫ 0.2mg/mL 的激动素溶液：精确称取 50mg 激动素，用少量盐酸溶解后，用水定容到 250mL。

【实验内容与步骤】

1. 培养基的制备（体积 1L）

（1）愈伤组织诱导培养基（RM-1965）

① 称取琼脂 10g，放入盛有约 500mL 蒸馏水的量程为 1L 的烧杯中，加热溶解（注意加水体积不要太多）。

② 逐一加入①~⑩母液各 10mL，边加边搅拌。

③ 称取蔗糖 30g 加入烧杯中，搅拌均匀后加蒸馏水至 1000mL。

④ 用 1mol/L NaOH 调 pH 为 5.6~6.0。

⑤ 把溶液装入三角瓶，每瓶 25mL，于高压灭菌锅中 1.05MPa（121℃）蒸气压力下灭菌 15~20min，冷却后备用。

（2）分化培养基

除生长素和激动素按后面浓度比例加入外，其他与 RM-1965 培养基成分相同。共分 6 个处理，各处理重复 4 个以上。调整 pH，分装及灭菌与诱导培养基相同。

表 34-1　各处理中生长素和激动素浓度配制表

编号	生长素浓度/（mg/L）	激动素浓度/（mg/L）
1	0	0
2	0	0.2
3	2	0
4	2	0.2
5	2	0.02
6	0.02	2

2. 愈伤组织的诱导

（1）茎段的消毒：取高约 60cm 的烟草植株地上部分，去顶，去叶，切成约 7cm 长的小段，用 70%乙醇浸泡 3min，无菌水冲洗一遍后，用 10%安替福民浸泡 5min，更换

新的安替福民溶液再浸泡 5min，然后用无菌水冲洗 5 次，置无菌培养皿中备用。

（2）烟草髓的制备：在无菌条件下于超净工作台上，用最小号打孔器小心地将烟草髓组织取出 （可用小玻璃棒退出）。然后用手术刀将髓两端各切去 0.5cm，再将中间一段切成 2mm 左右的小圆片（注意烟草形态的上下方向）。

（3）接种：用长柄镊子向每个三角瓶中接入髓片 3 个，使形态学的下端朝下，用铝箔纸封住瓶口。

（4）培养：置培养室中，28℃人工光照条件下培养。

3. 器官的再分化

在无菌条件下将诱导出（约 3~4 周）的烟草愈伤组织，用手术刀小心地切成 2mm×2mm×2mm 的小块，用长柄镊子转接于分化培养基中，置 28℃培养室中人工光照培养，每周记录生长变化情况，5 周后统计观察结果。

4. 结果记录

（1）愈伤组织出现的时间。

（2）芽和根出现的时间。

（3）统计根、芽及全苗数。

【注意事项】

1. 整个实验过程都需无菌操作。
2. 接种时烟草叶片的形态学下端朝下放置在培养基上。

【思考与作业】

1. 培养基中加入的蔗糖对愈伤组织的生长起什么作用?
2. 实验中除培养基需高压灭菌外，还有哪些实验用品需无菌处理?
3. 不同浓度比例的生长素和激动素对愈伤组织的诱导及其分化有何影响?
4. 实验材料烟草髓片接入瓶中时，要求形态学下端朝下，为什么?

实验 35　DNA 的快速分离和提取

【实验目的】

理解十六烷基三乙基溴化铵（CTAB）法提取 DNA 的原理，并掌握提取方法。

【实验原理】

本实验介绍的 DNA 快速分离和提取方法，快速简便，适用于大多数幼嫩的植物组织，其中包括愈伤组织和原生质体中 DNA 的分离和提取。选用的材料少于 0.1g，不利用氯化铯密度离心和超离心，获得的 DNA 分子大小大于 50kb，纯度符合大多数的限制酶酶切以及进行基因组 Southern 分析的要求。十六烷基三乙基溴化铵（CTAB）法是实验室常用的分离 DNA 的方法，能高效地从植物组织中提取 DNA，每克鲜重组织的 DNA 得率为 100~500μg。

【实验材料】

浮萍叶片。

【器材和试剂】

1. 器材

研钵、牙签、高速台式离心机、恒温水浴锅等。

2. 试剂

提取液[1%CTAB（*m/V*），100mmol/L Tris-HCl，pH8.0，1.4mmol/L NaCl，20mmol/L EDTA，0.1%（*V/V*）巯基乙醇]、氯仿:异戊醇（24:1，*V/V*）、异丙醇、TE 缓冲液（10mmol/L Tris，0.5mmol/L EDTA，pH8.0）、NaAc（3mol/L，pH6.8）、乙醇。

【实验内容与步骤】

1. 称取 500mg 叶组织样品，置于研钵中，经液氮冷冻后，研成粉末。
2. 叶组织粉末在解冻前，加入 20mL 预热的提取液，置于 65℃水浴中，30min，不时地搅拌，混匀。
3. 加入 15mL 氯仿:异戊醇，反复倒置混匀，15min。
4. 在室温下，5000*g* 离心，5min，收集上清液。
5. 加入等体积的预冷的异丙醇，混匀，10~20s 后，沉淀 DNA。
6. 用灭菌后的牙签或枪头，挑取 DNA 沉淀物后，在含有 70%乙醇的烧杯中进行漂洗，然后用滤纸吸干乙醇。
7. 将 DNA 沉淀物溶于 250~500μL TE 缓冲液中。经 65℃水浴，短时间加热，以完全溶解 DNA 样品。
8. 加入 1/10 倍体积的 3mol/L NaAc 和 2 倍体积的 95%乙醇，沉淀 DNA。
9. 重复步骤 6。最后，将 DNA 溶于 250~500μL TE 中。

【注意事项】

如果植物样品不经液氮处理，提取液中的 CTAB 浓度需要提高到 4%（*m/V*）。在许多情况下，使用 0.1%（*V/V*）巯基乙醇，并不能完全抑制叶片中的氧化作用，但是，这种氧化作用不会影响限制性内切核酸酶的活性。如果使用的巯基乙醇浓度高于 0.1%（*V/V*），则会大大降低 DNA 的得率。为了避免蛋白质的共沉淀，加入异丙醇后，需立即挑取 DNA 沉淀物。

实验 36　叶绿体中 DNA 的分离和提取

【实验目的】

掌握提取叶绿体 DNA 的方法。

【实验原理】

制备 DNA 一般需要破碎组织、提取核酸和纯化几个步骤。因植物细胞有细胞壁，而且往往含有色素和酚类化合物，提取的纯度不是很高。通常采用的剧烈破碎细胞的方法，DNA 容易发生降解，色素也不易除净。本实验介绍一种可快速地从植物组织中分离，并获得分子质量高和纯度较高的叶绿体 DNA。

【实验材料】

菠菜叶片。

【器材和试剂】

1. 器材：分光光度计、组织匀浆器、离心机、恒温水浴、冰箱或冷库等。

2. 试剂：

（1）缓冲液A（含 0.3mol/L山梨醇，0.05mol/L MES-KOH，0.01mol/L KCl，0.01mol/L α-巯基乙醇，5mmol/L EDTA，1mmol/L $MgCl_2$，2mmol/L抗坏血酸，1mmol/L $MnCl_2$，0.8mmol/L K_2HPO_4，pH6.1）。

（2）缓冲液B（含 0.3mol/L山梨醇，0.05mol/L HEPES-KOH，0.01mol/L KCl，0.01mol/L α-巯基乙醇，2mmol/L EDTA，1mmol/L $MgCl_2$，1mmol/L $MnCl_2$，0.8mmol/L K_2HPO_4，pH7.6）。

（3）$MgCl_2$。

（4）Dnase I。

（5）EDTA。

（6）缓冲液 C（含 0.35mol/L 蔗糖，0.02mmol/L EDTA，0.05mol/L Tris-HCl，pH7.8）。

（7）缓冲液 D（含 0.5mol/L 蔗糖，0.02mmol/L EDTA，0.05mol/L Tris-HCl，pH7.8）。

（8）缓冲液E（含 14mmol/L $MgCl_2$，100mg/mL DnaseⅠ，按照 1kg叶子提取的叶绿体沉淀悬浮于 70mL缓冲液的比例）。

（9）缓冲液 F（含 0.05mol/L NaCl，0.1mol/L EDTA，pH8.0）。

（10）缓冲液 G（含 0.01mol/L Tris-HCl，0.01mol/L NaCl，0.5%SDS，pH8.3）。

（11）蛋白酶 K。

（12）重蒸苯酚（用 0.5mol/L Tris-HCl，0.01mol/L EDTA，0.01mol/L NaCl，0.5% SDS，pH8.3 饱和）。

（13）Tris-EDTA 缓冲液（0.01mol/L Tris-HCl，1mmol/L EDTA）。

（14）氯仿:异戊醇（24:1，*V*/*V*）。

（15）醋酸钠（3mmol/L，pH5.2）。

（16）无水乙醇。

【实验内容与步骤】

1. 本实验取 75g 生长约 1 个月左右的菠菜叶片（3~6cm）。此时叶片中叶绿素含量较少，而 DNA 含量相对较高。

2. 将洗净并去除中脉的叶片剪碎，然后加入 250mL 预冷的缓冲液 A，用高速组织匀浆器快速短暂匀浆叶片至米粒大小。匀浆液用两层尼龙布夹两层纱布过滤，滤液经 2000*g* 4℃离心 40s 后，弃去上清液，沉淀用 80mL 缓冲液 A 悬浮，再离心（同上）。

3. 将离心后的沉淀悬浮在 30mL缓冲液B中，用裹着棉花的玻璃棒轻轻地搅动，沉淀悬浮后在大于 2000*g*离心 20~25min，沉淀重悬于 20mL缓冲液B中，并加入$MgCl_2$，使溶液中Mg^{2+}终浓度为 15mmol/L。在此重悬液中加入DnaseⅠ（终浓度为 75μg/mL），然后置于冰浴中，其间偶尔搅动。1h后加入EDTA（终浓度为 25mmol/L），终止反应后，于 3000*g* 4℃离心 5min。

4. 将离心后的沉淀物悬浮在 20mL 缓冲液 C 中，重复离心一次，沉淀重悬于该溶液中，然后将它小心加入 15 mL 缓冲液 D 中，于 7000g 4℃离心 5min，得到叶绿体粗沉淀。将此

沉淀悬浮于 5mL 缓冲液 D 中，用 40%、80% 不连续密度梯度在 3000g 4℃离心 5min，完整叶绿体沉淀位于 40%~80% 之间。如不立即提取 DNA，可将此叶绿体沉淀保存于干冰中。

5. 将获得的叶绿体沉淀悬浮于 5.25mL 缓冲液 E 中，置冰浴 30min 水解核 DNA。然后加入 EDTA（终浓度为 50mmol/L）终止反应，在 1000g 4℃离心 10min，沉淀用等体积缓冲液 F 洗 2 次后，再悬浮于缓冲液 G 中，加入蛋白酶 K（50g/mL），37℃处理 4~6h 后冷却至室温。

6. 用等体积重蒸苯酚抽提，在 20 000g 4℃离心 10min，以除去蛋白质，然后将沉淀悬浮于 5mL Tris-EDTA缓冲液中，再于 20 000g 4℃离心 10min。将离心后的水相与重蒸苯酚抽提的水相合并，然后加入等体积氯仿:异戊醇，再用 4000g 4℃离心 5min，取水相加 2 倍体积无水乙醇和 1/10 倍体积的醋酸钠（3mmol/L，pH5.2），并于–20℃冰箱过夜沉淀DNA。此沉淀经离心即得DNA，测定吸光度来判断DNA的质量，A_{260}/A_{280}比值一般在 1.8~2.0 之间。提取的DNA质量较高，可以用于酶切分析或其他分子实验。

实验 37　植物组织的各种基因转化体系

【实验目的】

了解常用的植物基因转化方法，理解不同的转化原理，掌握根癌农杆菌介导法的实验技术。

【实验原理】

植物基因转化体系是指以离体培养的植物组织、细胞及原生质体作为受体，通过某种途径和技术将外源基因导入植物细胞中，并使其在受体细胞或再生的植株中稳定保留和表达，最后通过有性或无性繁殖传递给后代。

自 1983 年首例转基因植物问世以来，随着转基因技术的不断创新和改进，迄今转基因成功的植物种类已达 120 多种。植物的基因转化方法主要有农杆菌介导的基因转移、病毒载体介导的转化和各种物理、化学方法所介导的基因直接转移等。我们重点学习农杆菌介导的基因转移和真空渗透法转化拟南芥。

I　根癌农杆菌介导的烟草叶块组织转化

根癌农杆菌介导的烟草叶块组织转化以及转基因植株的再生是整个基因工程早期发展过程的重大突破之一。下面介绍的方法是一种改进的根癌农杆菌和叶块组织共培养法，这种方法大大提高了烟草叶块的基因转化效率和转基因植株的发生频率。

【实验材料】

烟草、带有 pBIN437 质粒的根癌农杆菌 LBA4404 或 EHA105。

【器材和试剂】

1. 器材

消毒灭菌锅、细菌培养摇床、离心机、超净工作台、真空减压仪等。

2. 试剂

（1）链霉素 100mg/L、卡那霉素 300mg/L、头孢霉素 500mg/L、95%酒精。

（2）YEB 培养液（蔗糖 5.0g+蛋白胨 5.0g+牛肉提取物 5.0g+酵母提取的 1.0g，pH7.2）。

（3）MS 培养基参见附录Ⅲ。

（4）初级选择性培养基（MS+300mg/L 卡那霉素+500mg/L 头孢霉素，pH5.7）。

（5）次级选择性培养基（MS+100mg/L 卡那霉素+500mg/L 头孢霉素，pH5.7）。

（6）生根培养基（MS+25mg/L 卡那霉素，pH5.8~6.0）。

【实验内容与步骤】

1. 农杆菌的冰融转化

将含有质粒 pBIN437 的农杆菌接种于 50mL 的含有链霉素的 YEB 培养液（100mg/L）中，在 30℃下振荡培养过夜（质粒 pBIN437 的宿主菌株根癌农杆菌 LBA4404，带有链霉素抗性基因）。吸取过夜培养的悬浮液 5mL，接种于 50mL 链霉素的 YEB 中，在 30℃下，继续振荡培养 4h 后，4℃下离心（1000g，20min），沉淀细胞，并在 4℃下，用 30mL 的 TE 洗涤后，再沉淀细胞。重新将细胞悬浮于 5mL TE 中。将 500μL 的细胞悬浮液与 0.5~1.0g 质粒 DNA 混合后，置于冰块中 5min 后，浸入液氮中，冰冻 5min 后，将混合物置于 37℃的温水浴中 5min，融解混合物，加入 1mL LB 培养液，28℃下培养 6h。将 500μL 的混合物涂布于含有合适抗生素的 LB 平板上。在 28℃下培养 48h，从培养皿中，挑取单个菌落，转移到另一个含有合适抗生素的 LB 平板上，继续在 28℃下培养 28h，待用。

2. 无菌叶块组织的制备

用 95%酒精处理烟草种子 5min，进行表面消毒。用无菌水漂洗 5 遍，接种于 MS 培养基中，萌发。并置于 28℃的光照下，让烟草小植株生长至高度约 8~10cm 左右。用解剖刀切取带有 2 张小叶的茎段，转移至另一新配制的 MS 培养基中。让植株生长 4~5 周，在此其间，植株可作为无菌叶块组织的来源或再进行转移。

3. 农杆菌和叶块的共培养

取出 1 或 2 片无菌烟草叶片，用打孔器或解剖刀制备直径约 1cm 的叶圆片或叶块，置于无菌的培养皿中；加入已经培养过夜，正在快速生长的根癌农杆菌液 5mL，盖上培养皿盖，置于真空干燥器中，减压抽真空，至叶块的边缘出现小气泡为止。停止减压并维持 2min。然后，将干燥器移入无菌的超净台内，缓慢地打开气阀，以保持压力平衡。最后，取出含有农杆菌的叶块，用无菌的滤纸完全吸干叶块，反向置于 MS 培养基平板中，每个平板可接种 10 个叶块。盖上培养皿盖后，用胶带封口，置于 28℃左右的弱光下 1 天，然后，转移至荧光灯下，培养 6 天，直到叶块边缘开始长出农杆菌为止。

4. 转基因烟草植株的发生

将叶块从共培养的平板中转移至幼芽分化的初级选择性培养基中，置于培养箱约 2 周。然后，再将叶块转移至幼芽分化的次级选择性培养基中，继续培养 2 周。随着愈伤组织的形成、生长和分化，将叶块切成含有愈伤组织的单个小块。在幼芽发生后，将愈伤组织转移至含有 50mL 次级选择性培养基中。再过 2 周后，重复上述步骤，必要时可

以重复若干次。当幼芽达到 3~5cm 时，用解剖刀切除 2cm 以下的叶片和气生根，在离开愈伤组织基部的 0.5cm 上方，切成 45° 的斜面。并将幼苗转移到含有 50mL 生根培养基中，将切取的茎直接插到琼脂培养基的底部。

5. 烟草植株的转移以及在温室中的生长

在发根培养基中，幼苗根系开始形成，为了避免真菌和细菌的感染，将小植株转移至 MS 培养基中生长 2 天，转移到新的 MS 培养基中再生长 2 天。最后，将小植株移入土壤中生长。

【注意事项】

1. 从种子的消毒开始到幼苗的获得、从幼苗切取小叶块、小叶块和农杆菌的共培养、选择培养，以及转基因烟草植株的获得，整个过程都需注意无菌操作，避免污染。

2. 在共培养过程中注意时间和光照条件的变化。

Ⅱ 真空渗透法转化拟南芥

真空渗透法（vacuum infiltration）是一种活体水平的植物转基因方法，操作简便，对拟南芥的转化可得到很好的效果。由于该方法是在活体水平上直接对植物的花序进行转化操作，所以植物良好的生长状态是保证转化效率的关键。一般应选用苗壮、花序分生组织发达和年幼的植株。植株过老，细胞对农杆菌的敏感性大大下降；同时，渗透操作对植物会造成损伤，瘦弱的植株在抽真空后难以存活，或者难以收获晚期花所结的果荚和种子。

【实验材料】

拟南芥（Nossen 株系）种子和幼苗，农杆菌。

【器材和试剂】

1. 器材

高速冷冻离心机、真空箱、抽气泵、微量移液器等。

2. 试剂

渗透培养基（每 1000mL 含 1/2MS，5%蔗糖，0.5g MES，用 KOH 调至 pH5.7；再加 10~11mg/mL 的 6-BA 母液，200μL Silwet-77）、次氯酸钠（活性氯 5.2%原液，用无菌水临时稀释 7%使用，另加 1 滴 Tween-20）、琼脂、卡那霉素。

【实验内容与步骤】

1. 播种和幼苗的获得

（1）将培养杯装满土壤，用一张窗纱网覆盖。土壤要装足，但也不要装得过紧以影响透气性。要确保纱网与土的表面接触，否则萌发的幼苗将难以穿过网眼。当土吸足培养液后即可播种（建议在直径为 7cm 的培养杯里选 5 处，每处种几棵，萌发 1 周后，每处只留下 1 棵最好的苗）。

（2）将萌发的植物培养至茎高约 3cm 时，去除其顶生花序。注意避免伤及腋生花序。去除顶生花序将刺激腋生花序的生长。转化必须在去除顶生花序 4 天后进行。

（3）转化前，将已授粉的花序以及果荚去除掉。并使土壤吸足水。

2. 真空渗透操作

（1）制备好已转化了相应质粒的农杆菌菌液 10mL，转化前 1 天，转入大瓶培养过夜，第 2 天取出，使用时农杆菌液OD_{600}应在 1.2~1.6 之间。室温 5000r/min离心 15min。弃上清，将农杆菌沉淀悬浮于相应体积的渗透培养基里，使OD在 0.8 左右。

（2）将农杆菌悬浮液倒在搪瓷盘中，将长有植物的培养杯倒扣其间，一定要保证植株包括基生叶以上部分都浸没于菌液中，中间不能有大的气泡，放入真空箱中，用 15cm 汞柱的弱压抽真空 10~15min，经此操作的植物叶色略有加深。

（3）放气后，取出转化植物，横放在一个塑料盘内，盖上透明的塑料盖子以保持湿度，移入恒温室培养，第 2 天可开盖，垂直培养。

（4）种子经 70% 乙醇处理 2min，再用次氯酸钠处理 15min，在上述处理时要不停地悬浮种子，最后用无菌水洗 4 次。处理后的种子每 1500 粒悬浮于 6mL 0.1% 琼脂水溶液中，用 1mL 微量移液器均匀涂布于 150mm 直径的筛选平板（MS，1% 蔗糖，pH5.7；0.8% 琼脂，卡那霉素 30mg，Nossen 50mg/L）上，4℃处理 1~2 天，移入 22℃恒温室培养。转化子将很容易鉴别出来：深绿色的子叶，根较长，即可转入土壤；非转化子子叶发黄，根短，不能长期存活。如已确定转化子，而生长不佳时，可将其转入不加抗生素的平板中，使其茁壮生长。但若已长霉菌，则应立即转入土壤中。

【注意事项】

1. 横放时不能使植物的叶子、花序等器官碰到盘壁，以免污染。

2. 透明盖一定要盖好，以维持湿度，转化后的 6~7 天里，最好用塑料膜做成桶状将培养杯分隔开培养，其上盖一层保鲜膜，继续分隔培养。

3. 转化后，植株移到的恒温室温度不能超过 22℃。在转化后的 6~7 天才可浇少量的水，但不能直接对着植株浇水。培养 3~4 周后，收获种子，于干燥环境中存放 2 周。

实验 38　矿质元素缺乏症状的观察及光合指标的测定

【实验目的】

理解矿质元素对植物生长发育的重要性。

【实验原理】

植物需要各种矿质元素来维持正常的生理活动，以组成植物本身或用以调节其生理功能。溶液培养法（水培养法）是研究哪些元素为植物生命活动所必需，以及这些元素的生理功能和相互关系的基本方法。当溶液中缺乏某种必需元素时，植物就会表现出这种元素的缺乏症状，而其他元素并不能代替。只有当补充所缺乏元素之后，症状方能消失。不同植物不同生长期对同一元素的敏感程度不同，症状消失所需的时间也不同。

矿质元素缺乏症状会表现在叶片上，例如，植物缺氮时，老叶先失绿，严重缺氮时，老叶完全变黄；缺磷时，叶色暗绿，某些植物的叶片有时呈紫红色；缺钾时，老叶症状较明显，叶片出现花斑状或叶缘缺绿。植物形态特征的变化是由生理变化引起的，而且总是滞后于生理变化，因此将叶片光合色素的含量、净光合速率和呼吸速率等生理指标的测定与形态特征观察相结合能更好地反映出在不同缺素条件下植物的生长状况。

【实验材料】

具有三个以上真叶的番茄幼苗。

【器材和试剂】

1. 器材

800mL 白瓷缸 6 个、10mL 和 1000mL 量筒、移液管、滴管、普通棉花、研钵、漏斗、试管与试管架、锥形瓶、水浴锅、扫描分光光度计、光合仪和氧电极仪。

2. 试剂

pH 试纸、0.1mol/L HCl、0.1mol/L NaOH、95%乙醇、石油醚、10%盐酸、20% NaOH 乙醇溶液、醋酸铜、丙酮。

【实验内容与步骤】

1. 溶液培养与缺素症的观察

（1）培养番茄幼苗

首先将种子浸泡 12h，直播于蛭石中，温室中培养，待幼苗长出三个以上的真叶后，即可移植到营养液中。

（2）营养储备液的配制（采用 Hoagland 营养液配方）

大量元素均配制成 1mol/L的母液，分别是KNO_3、KH_2PO_4、$Ca(NO_3)_2$、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$、KCl、$CaCl_2$、Na_2SO_4、NaH_2PO_4、$NaNO_3$、$Mg(NO_3)_2$。

EDTA-Fe的配制：将 2.68g乙二胺四乙酸二钠（$Na_2C_{10}H_{14}O_3N_2$）溶解在 1000mL蒸馏水中，加热，趁热加入 1.980g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$， 并搅拌均匀。

微量元素：分别称取H_3BO_3 2.68g、$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.222g、$NaMoO_4$ 0.025g、$MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 2.11g、$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.079g，共同溶于 800mL蒸馏水中，加水至 1000mL。

（3）培养液配制

先用带刻度的烧杯量取约 600mL 蒸馏水， 按表 38-1 分别加储备液（mL）配成完全的和不完全的营养液，并用 0.1mol/L HCl 或 0.1mol/L NaOH 调 pH 为 5.6~6.0 后，定容到 800mL，置入带盖白瓷缸中（需要预先彻底洗净）。每个处理做好标记。

表 38-1 培养液配制表

处理储备液	完全	缺 K	缺 Ca	缺 Mg	缺 N	缺 P
KNO_3/mL	2		2	2		2
KH_2PO_4/mL	2		2	2	2	
$Ca(NO_3)_2$ / mL	3	3		3		3
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$/mL	2	2	2		2	2
KCl/mL					2	2
$CaCl_2$/mL					3	
Na_2SO_4/mL				2		
NaH_2PO_4/mL		2				
$NaNO_3$/mL		2				
$Mg(NO_3)_2$/mL			3			
EDTA-Fe/mL	2	2	2	2	2	2
微量元素/mL	1	1	1	1	1	1

（4）幼苗移植：选择健壮且长势一致的幼苗，测量并记录株高。用水浸泡几分钟，洗净根部蛭石，用棉花轻裹茎基部，小心固定在白瓷缸盖的孔内，切忌避免让基部受到损伤，并使根部恰好浸于营养液中，移栽后放于培养室内。

（5）观察幼苗的生长情况，记录缺素症出现的日期、部位以及株高的变化，每 3 天作一次记录。隔 3 天通气一次并调 pH 至 5.6~6.0。实验结束时，测量株高。

2. 叶片净光合速率的测定

当番茄出现缺素症后，采用 LI-6400 光合测定系统来测定完全培养和缺素培养后叶片的净光合速率等指标（详细操作过程见附录）。

选取需要测量的植物叶片（3~5 次重复）。测量时间请尽量选择上午 10：00~11：30 左右，如果植物叶片是处于室内或生长箱内，由于其叶片气孔没有完全开放，需要先用饱和光强来进行气孔诱导，可以用 400W 的灯泡来照射（约 20min），或者在室外光照条件下活化（小于 2min）。

夹上叶片（尽量让叶片充满整个叶室空间，此时测量的植物叶片面积为 $6cm^2$，如果无法充满，需要用叶面积仪来确定叶面积，关闭叶室，读数稳定后即可记录，约 0.5~1min，判断标准是小数点后最后一位数字的波动在 0.2 左右。如果在实验室内测量，波动较室外稍大）。换叶片进行下次测量。记录测定结果，包括净光合速率、蒸腾速率、气孔导度，并比较完全培养和缺素培养叶片的各指标的差异。

3. 呼吸速率的测定

当材料缺素症明显后，测定光合速率的同时测定呼吸速率，采用英国 Hansatech 公司生产的液相氧电极仪 Chlorolab-2（详细操作过程见仪器使用说明书）进行。

称取 0.5g 材料并剪碎（大小均匀一致，尽可能小），放入 1.5mL 离心管中后，加入 1mL 蒸馏水，使材料均匀悬浮，装入氧电极仪的反应杯中进行测定，做好记录。并比较完全培养和缺素培养叶片呼吸速率的差异。

4. 光合色素的提取分离和含量测定及理化性质的观察

（1）光合色素的提取

精确称取完全培养的叶片 2g，将叶片剪碎，放在研钵中，加入约 5mL 的 95%乙醇，研磨，将乙醇提取液通过干燥滤纸过滤到干燥的 10mL 容量瓶中。然后再加入少量的 95%乙醇继续研磨提取，直到绿色消失为止。最后定容到刻度备用。其他缺素培养的叶片各称 0.5g，用 3mL 95%乙醇提取叶绿素，滤纸过滤后收集滤液，测定吸光度。

（2）光合色素含量的测定

将上述各色素提取液取少许（根据叶绿素的具体浓度确定）稀释到 5mL 后，用 95%乙醇为对照，分别测定 440nm、665nm、649nm 处的吸光度值。

光合色素含量的计算公式如下：

$$C_a = 12.7A_{665} - 2.69A_{649} \tag{38-1}$$

$$C_b = 22.9A_{649} - 4.68A_{665} \tag{38-2}$$

$$C_{a+b} = 20.2A_{649} + 8.02A_{665} \tag{38-3}$$

$$C_k = 4.7A_{440} - 0.27C_{A+B} \tag{38-4}$$

式中，C_a、C_b、C_{a+b}、C_k分别为叶绿素a、叶绿素b、叶绿素a+b、类胡萝卜素的浓度；A_{665}、A_{649}、A_{440}分别为 665nm、649nm、440nm处的吸光度值。

（以下内容为选做部分）

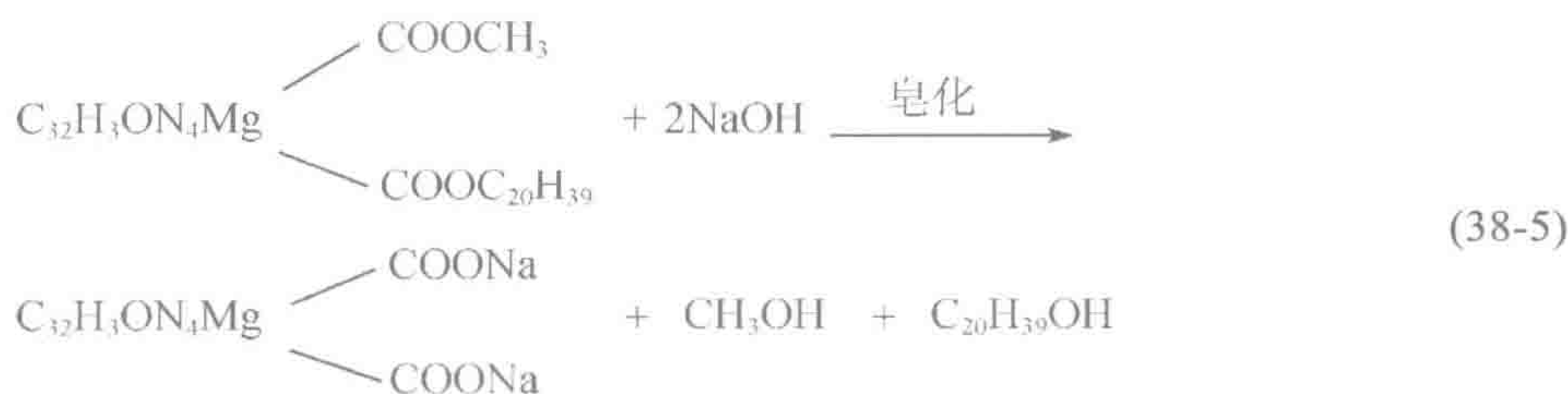
（3）荧光现象的观察

将叶绿素提取液置于光下，观察其反射光的颜色。

（4）光合色素的分离

① 叶黄素和叶绿素的分离：取 3mL 提取液于试管中，加等量的石油醚振荡成乳浊分层 （如分层不明显，可再加少量石油醚），因叶绿素与胡萝卜素易溶于石油醚，所以上层为绿色、下层为叶黄素，把乙醇染成黄色，如果分层不明显，可加 1~2 滴水。

② 胡萝卜素的分离：叶绿素是一种双羧酸的酯类，能与碱发生皂化作用，生成叶绿酸的盐，其反应式为



$$C_{32}H_3ON_4Mg\begin{cases}COOCH_3\\COOC_{20}H_{39}\end{cases}+2NaOH\xrightarrow{\text{皂化}}C_{32}H_3ON_4Mg\begin{cases}COONa\\COONa\end{cases}+CH_3OH+C_{20}H_{39}OH\qquad(38\text{-}5)$$

取 3mL 提取液于试管中，加 1mL 20%NaOH 乙醇溶液，摇匀后，放在水浴上煮沸，冷却后，加入 3mL 石油醚，振荡并分层，上层为黄色的胡萝卜素，下层为叶绿酸的钠盐和叶黄素。

（5）光合色素的吸收光谱

取上面分离的叶黄素、胡萝卜素及叶绿素溶液，依次置于扫描分光光度计的样品室中，对各色素溶液进行扫描，观察各色素的吸收带。

（6）用氢和铜离子取代叶绿素的镁离子

取 5mL 提取液于试管中，加 1~2 滴 10%HCl，由于氢离子取代了叶绿素分子中的镁离子从而生成褐色的黑籽酸，然后在黑籽酸中加入少量醋酸铜晶体，水浴加热，溶液由褐色转变成暗绿色，铜离子又取代了黑籽酸中的氢离子。

【注意事项】

1. 配制培养液时先量取水，然后分别按照表 38-1 中的要求加入高浓度的盐，充分混合均匀后再加入另一种，所有的都加完后，用 10%HCl 或 10%NaOH 调 pH 为 5.6~6.0，定容到 1L。

2. 移植幼苗时选择健壮且长势一致的幼苗，切忌基部受到损伤。

3. 测定光合色素时，取少量稀释后测定。

【思考与作业】

1. 描述各种元素的缺素症，包括最早出现的部位、根生长情况、叶片颜色的变化等现象，并分析产生这些不同症状的可能原因。

2. 比较缺素培养和完全培养的叶片净光合速率和叶绿素含量的差异， 试解释可能

的原因？

实验 39　激动素对叶片的保绿效应及对离体叶片中 SOD 酶活性的影响

【实验目的】

1. 加深对细胞分裂素保绿作用的认识，了解细胞分裂素延缓植物叶片衰老的作用机制。

2. 掌握测定氧自由基含量的羟胺氧化法。

3. 掌握 SOD 酶活性测定的原理和方法。

【实验原理】

衰老是植物体生命周期的最后阶段，是成熟的细胞、组织、器官和整个植株自然地终止生命活动的一系列衰败过程。其中叶片衰老是植物生长发育的最后阶段，叶片黄化是叶片衰老的最明显特征，即叶绿素逐渐丧失，同时伴随叶绿体结构的破坏，导致光合功能衰退，呼吸活动增强，光合产物的生产、供应逐渐减少。尽管衰老是无法避免的自然现象，但如果能够认识衰老的机理，推迟衰老的进程则是可能的。叶片的衰老是一个不可逆的走下坡路的正常阶段，叶片的衰老阶段包括一系列代谢变化，错综复杂。目前提出的植物衰老机理假说主要有基因调控假说、激素平衡假说、氧自由基损伤假说和营养胁迫假说。

激素平衡假说认为衰老与五大类植物激素密切相关。生长素、细胞分裂素和赤霉素可明显地推迟离体叶片的衰老；脱落酸和乙烯可加速离体叶片的衰老，而且不同的激素作用效果不同，其中细胞分裂素延缓衰老作用最显著。细胞分裂素延缓衰老的机制之一就是通过调节某些酶的活性，进而抑制自由基的破坏作用。自由基假说认为植物衰老是由于植物体内产生过多的自由基，对生物大分子如蛋白质、核酸、膜蛋白以及叶绿素有破坏作用，使器官及植物体衰老、死亡。正常情况下，植物体中超氧化物歧化酶（superoxide dismutase ECl.15.1.1，SOD）、过氧化物酶和过氧化氢酶等酶的协同作用防御活性氧或其他过氧化物自由基对细胞膜系统的伤害，从而防止细胞的衰老。SOD 是需氧生物中普遍存在的一种含金属的酶，可以催化氧自由基的歧化反应，生成过氧化氢，过氧化氢又可以被过氧化氢酶（CAT）转化成无害的分子氧和水。



$$2O_2^{-}\cdot + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$



$$2H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2H_2O + O_2$$

离体的植物叶片会很快衰老，但如提供外源激动素（一种细胞分裂素）则能明显地延缓叶片的衰老过程，其中一个重要的原因是使 SOD 的活性维持在一个较高的水平上。所以在生产上常利用激动素的这种效应延长蔬菜储藏和市场上的供应时间。

超氧化物歧化酶活性的测定是根据照光时，体系中产生的氧自由基使硝基四唑蓝还原成蓝色甲腙（后者在 560nm 处有最大吸收），而超氧化物歧化酶作为氧自由基的清除剂可抑制此反应。一个酶活单位定义为将硝基四氮唑蓝的还原抑制到对照一半（50%）时所需的酶量。

【实验材料】

小麦叶片或其他植物叶片。

【器材和试剂】

1. 器材

培养皿、移液管、滤纸、塑料布、研钵、10mL 具塞刻度试管、40W 荧光灯、分光光度计、台式离心机。

2. 试剂

0.4mg/mL 激动素溶液、提取介质[50mmol/L（pH7.0）磷酸缓冲液，内含 1%不可溶聚乙烯吡咯烷酮]、反应介质[50mmol/L（pH7.8）磷酸缓冲液，内含 77.12μmol/L 硝基四氮唑蓝，0.1mmol/L EDTA，13.37mmol/L 蛋氨酸]、80.2μmol/L 核黄素溶液[用含有 0.1mmol/L EDTA 的 50mmol/L（pH7.8）的磷酸缓冲液配制]。

【实验内容与步骤】

1. 激动素保绿作用的观察

（1）将 0.4mg/mL的激动素溶液，用蒸馏水稀释成浓度为 1.0^{-3}mg/mL和 2×10^{-2}mg/mL的溶液各 20mL。

（2）取 3 套直径为 9cm的培养皿，编号，分别加入 0mg/mL、10^{-3}mg/mL、2×10^{-2}mg/mL激动素溶液各 20mL，每种处理做 2 个重复。

（3）摘取 7~10 天苗龄小麦幼苗的第一片叶子，剪去叶尖和叶基部，留下 2~4cm 长的中段备用。

（4）在每个培养皿中各放入 20 片小麦叶片段（称鲜重），使其漂浮在溶液中，盖好盖子。

（5）将培养皿置于人工气候箱，22℃放置 7 天，每天观察叶片褪色变黄情况并记录。7 天后，用滤纸吸干叶片表面的溶液，称重，即可用于酶活性测定。

2. 超氧化物歧化酶活性的测定

（1）酶的提取

将各种处理好的叶片剪成小段，分别称取 0.5g，置于预冷的研钵中，加入 5mL 预冷的提取介质（分几次加入），研磨成匀浆，2~4℃12 000r/min 离心 10min，上清液即是酶提取液。将上清液倒入另一试管中，冰浴保存备用，同时将沉淀用 95%乙醇浸提叶绿素。

（2）酶活性测定

取 5 支试管，编号，按表 39-1 加入试剂，将 4 号管用黑纸包住，与其他试管一起放在 500W白炽灯旁，54μmol/（$m^2\cdot s$）光强下照光 10min后关灯，用黑纸罩上试管（如室内光线不强，不罩黑纸也可）；以 4 号试管溶液为空白，测定样品在 560nm处的吸光度。不加酶的 5 号试管溶液颜色最深；加入酶的由于超氧化物歧化酶抑制了硝基四氮唑蓝的光还原，颜色变浅。

3. 叶绿素含量的提取

（1）将提取 SOD 酶后得到的沉淀用 3mL 95%乙醇充分悬浮，用滤纸过滤，收集的滤液即为叶绿素提取液。

表 39-1　各试管反应体系配制表

编号	1	2	3	4	5
反应介质/mL	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9
酶提取液/mL	0.02	0.02	0.02		
核黄素/mL	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
50mmol/L 磷酸缓冲液/mL				0.02	0.02
备注	叶片浸泡在蒸馏水中	叶片浸泡在 10^{-3}mg/mL激动素溶液中	叶片浸泡在 2×10^{-2}mg/mL激动素溶液中	做为空白	无酶反应液

（2）将叶绿素提取液稀释后，测定 649nm 和 665nm 下的吸光度，并记录。

4. 结果的计算和比较

（1）超氧化物歧化酶活性

$$超氧化物歧化酶活力=\frac{\Delta A\times N\times 60}{A_o\times W\times T\times 0.01\times 50\%} \tag{39-1}$$

式中，酶活力：每小时每克鲜重的酶活单位数（U）；A_o：5 号试管溶液在 560nm处的吸光度；ΔA：5 号试管溶液在 560nm处的吸光度值与加入酶液的反应液在 560nm处的吸光值的差；N：提取酶液的总体积（mL）；W：植物材料的鲜重（g）；T：照光时间（10min）；0.01：加入酶液的体积（mL）；60：60min（要计算 1h的酶活力）。

（2）叶绿素含量的计算

$$叶绿素含量=\frac{(20.04\times A_{649}+6.1\times A_{665})\times V\times M}{W} \tag{39-2}$$

式中，叶绿素含量的单位（mg/g）：表示每克鲜重含有的叶绿素；A_{649}：叶绿素溶液在 649nm处的吸光度；A_{665}：叶绿素溶液在 665nm处的吸光度；V：提取叶绿素的总体积（mL）；W：植物材料的鲜重（g）；M：稀释倍数。

【注意事项】

1. 选择绿色均匀的小麦叶片，保证所有材料贴于培养皿的滤纸上进行培养。
2. 提取 SOD 的全过程是在低温或冰浴条件下完成。

【思考与作业】

结合所学理论知识，分析细胞分裂素延缓叶片衰老的可能机制是什么？

实验 40　长春花愈伤组织的诱导培养及吲哚生物碱的提取测定

【实验目的】

掌握诱导和继代愈伤组织的方法，以及提取和测定生物碱的方法。

【实验原理】

在无菌条件下，对离体的植物组织（器官或细胞）进行人工培养，可以使已经停止分化生长的细胞重新分裂，形成没有组织结构的细胞团，即愈伤组织， 这一过程称为“脱分化作用”。长春花的愈伤组织细胞中含有多种吲哚生物碱，多数具有生物活性，因而是重要的药物。吲哚生物碱能以盐的状态稳定存在于酸性提取液中，此时可用有机溶剂石油醚萃取，去掉可溶于石油醚的所有杂质；再将提取液调成碱性，吲哚生物碱恢复游离状态，可被有机溶剂二氯甲烷提出，此时便得到纯化的吲哚总碱。吲哚总碱是多种性质相近的吲哚生物碱的混合物，薄层层析技术可以将这些性质相近的吲哚生物碱分开，其基本原理即基于吲哚生物碱的极性，能使极性不同的吲哚生物碱分离。另外，高效液相色谱仪可以十分灵敏地定性定量分析性质相近的吲哚生物碱。

【实验材料】

长春花植株（新鲜幼嫩的茎、叶、芽或根）。

【器材和试剂】

1. 器材

（1）玻璃器皿（50mL 锥形瓶、烧杯、量筒、玻璃棒、圆底烧瓶、层析缸、16cm × 5cm 玻璃板、60mL 分液漏斗）。

（2）无菌操作仪器（高压灭菌锅、超净工作台、酒精灯、剪刀、手术刀、镊子）。

（3）人工气候箱。

（4）离心机。

（5）高速分散器。

（6）旋转蒸发仪。

（7）电子天平。

（8）离心管（50mL 和 1.5mL）。

（9）烘箱。

（10）三用紫外线分析仪。

（11）移液枪（1~10μL 量程）。

（12）色谱分析相关设备和仪器（滤膜、滤器、高效液相色谱仪、紫外检测仪、色谱数据工作仪、进样器、0.22μm 和 0.45μm 滤膜、日本岛津 LC-4A 高效液相色谱仪、SPD-2AS 紫外检测仪、Anaster 色谱数据工作站）。

2. 试剂

MS培养基（参见附录Ⅲ）、10%安替福民、3mol/L H_3PO_4、2mol/L NaOH、无水甲醇、石油醚、二氯甲烷、色谱甲醇、氨水、磷酸二氢氨、甲醇为色谱纯、阿玛碱标品（Sigma 产品）、长春质碱标品（由上海康爱生物制品有限公司提供），其他试剂均为分析纯、水为去离子水。

【实验内容与步骤】

1. 长春花愈伤组织的诱导及继代培养

（1）培养基的配制

按表 40-1 所示 MS 培养基配方，预先配制大量元素、微量元素、铁盐和有机溶剂的

母液。根据配制的体积来计算用量，同时加入不同配比的激素制成诱导和继代培养基（表40-1），并调 pH 至 6.2，分装于 50mL 锥形瓶中，每瓶含有培养基 25mL，高压灭菌 20min，静置冷却备用。

表 40-1　诱导和继代培养基的配法

母液名称及浓度	配 1L 诱导愈伤培养基	配 1L 愈伤继代培养基
大量元素 20×	50 mL	50 mL
微量元素 Ⅰ 100×	10 mL	10 mL
微量元素 Ⅱ 1000×	1 mL	1 mL
铁盐 100×	10 mL	10 mL
有机溶剂 100×	10 mL	10 mL
琼脂	7g	7g
蔗糖	30g	30g
萘乙酸（NAA）1g/L	0.5 mL	2 mL
2,4-二氯苯氧乙酸（2,4-D）1g/L	1mL	—
6-苄基腺嘌呤（6-BA）1g/L	0.5 mL	1mL

（2）愈伤组织的诱导

剪取长春花新鲜幼嫩的茎、叶、芽或根，用自来水冲洗 30 min，再用蒸馏水反复冲洗，然后用 10%的安替福民或次氯酸钠浸泡 5 min 消毒备用。

在无菌条件下，用手术刀将消毒的植物材料切成 0.5cm 长宽的小块，再将小块的材料放入无菌水中反复冲洗，然后转接至培养基上（每瓶接种 3~4 块），26~28℃光培养。

（3）愈伤组织的继代培养

约 30 天，将诱导而来的愈伤组织从外植体上剥离，转至新的培养基上继代培养，以后每 20 天左右继代一次，接种量 0.5~1.0g/瓶，培养条件同上。

（4）愈伤组织生长的测定

将长春花愈伤组织从培养基上剥离，称鲜重（取 3 瓶组织鲜重平均值）。

2. 吲哚总碱的分离提取

（1）提取流程见图 40-1

（2）吲哚总碱的定量

用少许二氯甲烷将吲哚总碱从圆底烧瓶中洗入已称重的 1.5mL 离心管中，自然风干，再称重，重量差即为吲哚总碱含量。

3. 阿玛碱和长春质碱的定性定量分析

（1）薄层层析法

① 标准液的制备：精确称取阿玛碱标品和长春质碱标品各 5.0mg， 用无水甲醇配制成 1mg /mL 标准液，低温保存备用。

② 吲哚总碱样品液的制备：用少量（0.3mL 左右）二氯甲烷将 1.5mL 离心管中的吲哚总碱溶解，制成吲哚总碱样品液（现用现配）。

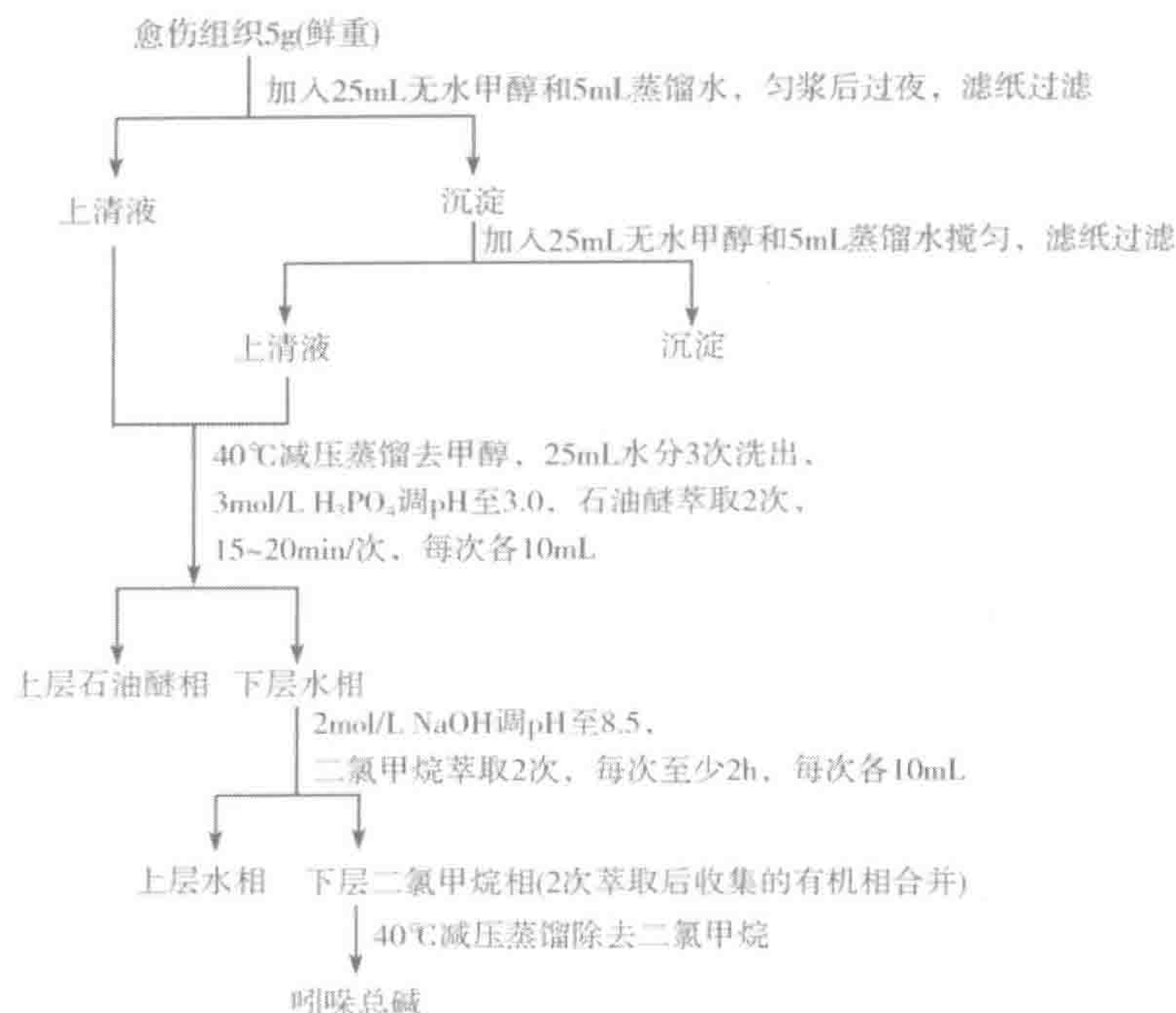


图 40-1　吲哚总碱提取流程图

③ 硅胶板的制备：称取 7.0g 硅胶粉Kieselgel 60 GF_{254}与 20mL 0.1mol/L NaOH混合搅匀，均匀铺在干净的玻璃板上（16cm × 16cm），平置、自然晾干后，110℃活化 1h，置于干燥器中备用。

④ 展层剂的配制。

氯仿:甲醇:石油醚 = 9:1:5（V:V:V）。

⑤ 点样：将硅胶板平置于干净桌面上，点阿玛碱和长春质碱标准液以及吲哚总碱样品液时，应待前一次样品液风干后，再点下一次，直至将样品液全部点完。样点直径最好控制在 3mm 之内，各样点应在一条直线上，间距约 2cm，样点位置距板下沿至少 2cm，以保证层析时样点位于展层剂之上。

⑥ 层析：将点好样的硅胶板垂直放入盛有展层剂的层析缸中，盖好，于通风橱内层析，待展层液行至距上沿 4cm 处停止，将硅胶板取出，自然风干。

⑦ 阿玛碱和长春质碱的定性定量：将硅胶板置于 365nm 紫外灯下观察，看到样品与标样在相同的 Rf 值处有亮绿色荧光点出现，即可证明样品中有阿玛碱存在。使用 ImageMaster VDC 进行薄层扫描即可测定出阿玛碱和长春质碱的含量。

（2）RP-HPLC 法

① 色谱条件。

色谱柱：Kromasil ODS C_{18}（250mm × 4.6mm，i.d：7μm）；

流动相：甲醇-0.005 mol/L $NH_4H_2PO_4$（pH7.0），V:V=70:30（流动相经 0.45μm滤膜过滤，超声脱气后使用）；

流速：1.0mL/min；检测波长：280nm；柱温：28℃；进样量：5μL。

② 制作标准曲线：用标准储备液配制适当浓度的系列标准液，按前述色谱条件进样分析（n=5），以峰面积和吲哚生物碱浓度（mg/L）进行回归。

③ 长春质碱和阿玛碱的定性定量分析：将吲哚总碱用甲醇定容至 1mL，用 0.22μm 滤膜过滤，按上述色谱条件进行分析，以峰面积外标法定量（注：所有数据均为 3 次平行重复测定的平均结果）。

【注意事项】

1. 提取生物碱时甲醇浸泡过夜的效果好，用二氯甲烷萃取时应该看到溶液澄清时再进行分离。

2. 薄层层析的平板一定要铺平，样品的上样量保证一致，分多次上样，而且加样点尽可能小。浸入展层液的下缘要平齐。

【思考与作业】

1. 愈伤组织的诱导和继代培养中应该注意什么？

2. 制备硅胶板的要点是什么？



第四部分

生态篇

实验 41　主要气候因子的测定

【实验目的】

在对植物生长发育过程产生直接或间接影响的生态因子中，热量和水分两个生态因子以及两者的组合往往是具有决定性意义的。本实验通过对太阳辐射强度、大气降水和蒸发、空气温度和湿度这五个生态因子的测定，使学生掌握几种常见的生态测试仪器的工作原理和使用方法，为认识植物与环境的相互关系打下基础。

Ⅰ　太阳辐射强度的测定

太阳辐射强度的观测包括天空总辐射、直接辐射、散射辐射、地面反射辐射，这里以天空总辐射为例进行介绍。

【实验器材】

天空辐射表的设计原理是以物体的热电效应为基础的。由康铜-铜制成热电堆，热电堆将吸收的热能转化为电能，输出为电压值，其输出量的大小与辐射强度成正比。

仪器的感应主体由透光罩、感应器、干燥器等组成。透光罩是双层石英罩，既可以滤去投在黑片上的大气长波辐射，也可以防止风吹去黑白片上的热量。感应器下面的干燥器内装有硅胶，以吸收罩内水分。辐射测定的计量器是灵敏度较高的电流表，常称为辐射电流表或微安表。测量时，将天空辐射表热电堆的热端（+）和冷端（–）分别与辐射电流表的正极和负极相连。

【实验内容与步骤】

1. 用仪器罩盖住感应面，松开电流表的绝电器进行零点读数，并记录测定时间。
2. 暴露感应面，待电流指针稳定后，每隔 10~20s 读数 1 次，连续读 3 次。

Ⅱ　大气降水的测定

大气降水是指从天空降落到地面上的液态水或固态水，以 mm 为单位，取 1 位小数。目前常用的测量降水量的仪器有雨量器、虹吸式雨量计和翻斗式遥感雨量计。这里以虹吸式雨量计为例进行介绍。

【实验器材】

虹吸式雨量计（图 41-1）由盛水器、浮子室、自计钟、记录笔和外壳等组成。降水从盛水器的盛水口落入，由盛水器的锥形大漏斗汇总经导水管流入小漏斗和进水管至浮子室。此时浮子室内水位上升，浮子升高并带动固定在浮子杆上的记录笔上升。同时装在钟筒上的自记纸随自计钟旋转，由装有自计墨水的笔尖在自计纸上画出曲线。当笔尖达自计纸 10mm 线上时，浮子室内液面即达到虹吸管的弯曲部分，由于虹吸作用，水从虹吸管中自动溢出，浮子下降至笔尖指零线时停住，继续降水时重复上述动作。

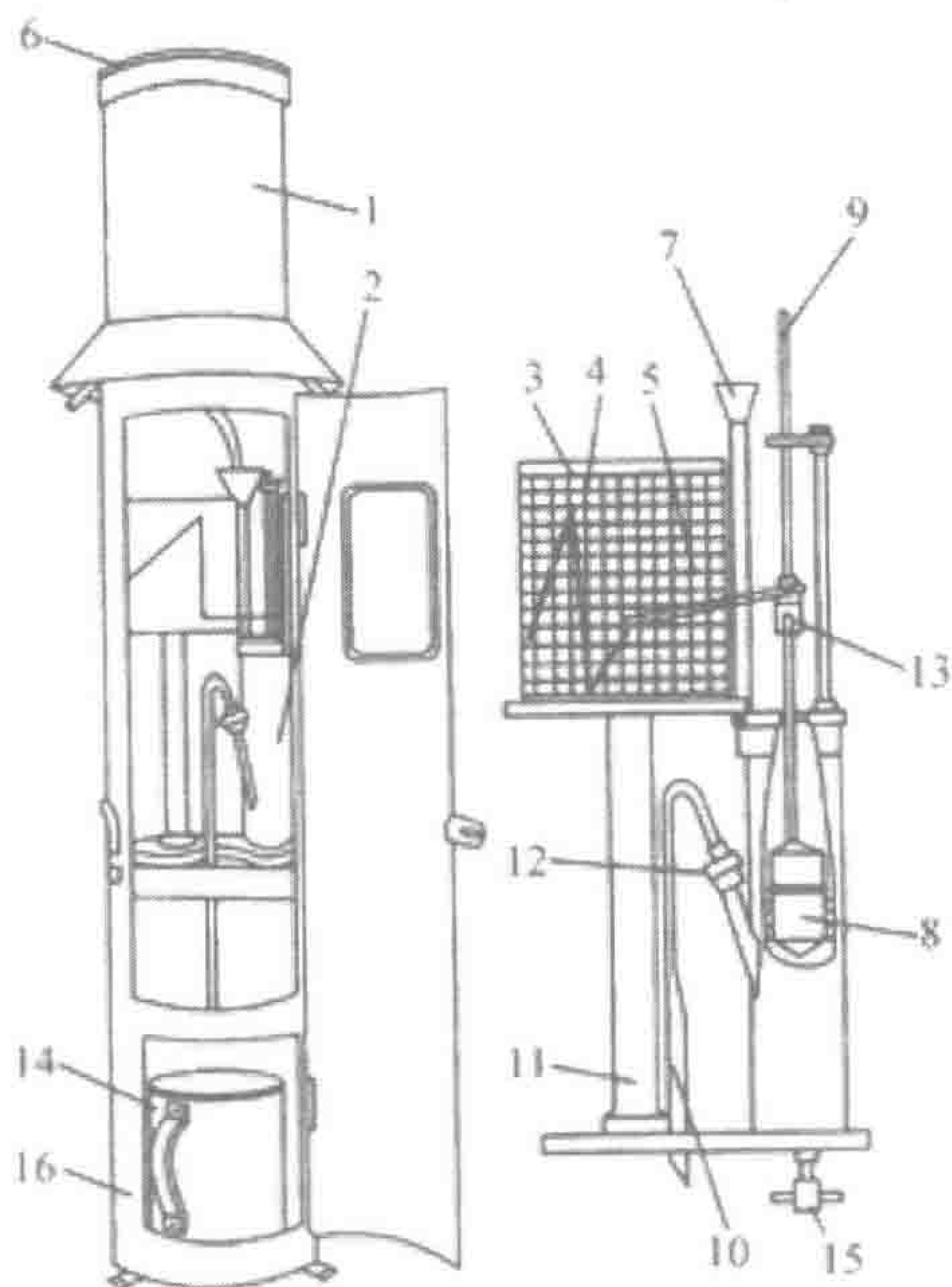


图 41-1　虹吸式雨量计

1. 盛水器；2. 浮子室；3. 自计钟；4. 装在钟筒上的自记纸；5. 记录笔；6. 盛水器的盛水口；7. 小漏斗；8. 浮子；9. 浮子杆；10. 虹吸管；11. 支柱；12. 弯曲管；13. 笔杆固定螺丝；14. 贮水筒；15.调节螺丝；16. 外壳

【实验内容与步骤】

（1）将虹吸式雨量计安装在观测场平整的地面上，用三根钢丝绳牵固，以免因振动使记录发生变化，盛水口面用水平仪调整至水平。

（2）用自计纸卷在钟筒上，再把自计钟上满发条放在支柱的钟轴上，保证齿轮啮合良好。

（3）将虹吸管的短弯曲端插入浮子室的出水管内，并用连接器密封紧固。

（4）将自计墨水注入笔尖，用手指夹住记录笔杆，使笔尖接触纸面。对准时间消除齿隙。

（5）将清水缓慢倒入盛水器至虹吸作用开始出现止，虹吸管溢流停止后，笔尖停留在零线上。偏离多时，要拧松笔杆固定螺钉进行粗调；微调时，用手指扳动记录笔杆，调节笔尖指零线。虹吸作用应在 10mm 上开始，若未达到或超过 10mm 线，需旋松虹吸管连接器，上下移动虹吸管。若虹吸作用不正常溢流时间超过 10s 时，可取下虹吸管，用软布系于绳中央，先用肥皂水后用清水擦洗。若虹吸时有气泡产生，不能溢完，说明虹吸管内漏气，可用白蜡或凡士林的油脂混合物涂堵密封。

（6）当仪器工作正常时，雨量记录有如下特点：无雨时，记录为水平线；有雨时，记录为平滑的上升曲线；当水从浮子室溢出时，记录为垂直线。贮水筒备校验降水量用。

Ⅲ　蒸发量的测定

蒸发量是指在一定口径的蒸发器中，水因蒸发而降低的深度。蒸发量以 mm 为单位，取 1 位小数。测定蒸发量可采用小型蒸发器。

【实验器材】

蒸发器是由钝化成金黄色的铜质皿和镀锌钝化成彩虹色的钢质防禽圈组成。铜质皿是由内径 20cm 的承水口、圆筒以及出水嘴构成。

【实验内容与步骤】

1. 蒸发器的安装

在观测场地内的安置地点竖立一根圆柱，柱顶安一圈架，将蒸发器安放其中，蒸发器口缘面用水平仪调整至水平，保持蒸发器口缘面距地面高度 70cm。

2. 测量

每天 20：00 进行观测，测量前一天 20：00 注入的 20mm 清水（即今日原量）经 24h

蒸发剩余的水量，计入观测簿余量栏。然后倒掉余量，重新量取 20mm（干燥地区和干燥季节需量取 30mm）清水注入蒸发器内，并计入观测簿次日原量栏。蒸发量计算式如下：

$$蒸发量=原量+降水量-余量$$

Ⅳ　空气温度的测定

一般观测中测定的是离地面 1.5m 高度处的气温，包括三项：空气温度、空气最高温度和空气最低温度。

【实验器材】

常用的测定温度的仪器有最高温度表、最低温度表、自计温度计等。

【实验内容与步骤】

1. 最高温度表

最高温度表专门用于测定一定时间间隔内的最高温度，其构造与普通温度表不同。它的感应部分有一个玻璃针，深入毛细管使感应部分与毛细管之间形成一窄道（有的是感应部分和毛细管相接处特别窄）。气温上升时，感应球内水银体积膨胀产生压力，压力大于窄道处摩擦力可将水银挤过窄道挤入毛细管，毛细管中水银柱上升；气温下降时，球部内水银收缩，由于窄道极小，窄道摩擦力大于水银柱的内聚力而不能缩回感应部分，水银就在此处中断。因而处在窄道上部的水银柱顶端的示度就是一定时间内曾经出现过的最高温度值。

调整方法：手握住表身，球部向下，磁板面与甩动方向平行；手臂向外伸出约 30°的夹角，用大臂将表前后 45°范围内甩动，毛细管内水银就可落入球部，使示度接近当时的干球温度。调整后放回时应先放球部再放表身。动作要迅速，避免日光直接照射，甩动角度不得过大，以防止球部翘起。

2. 最低温度表

最低温度表是用来专门测定一定时间间隔内最低温度的仪器。它的测温液是酒精，它的毛细管内有一哑铃形的小游标。最低温度表水平放置时，游标停留在某一位置。当气温上升时，酒精膨胀绕过游标而上升，而游标由于其顶端对管壁有足够的摩擦力，能维持在原位不动；当温度下降时，酒精柱收缩道与游标顶端相接触，由于酒精液面的表面张力比游标对管壁的摩擦力要大，使得游标不致突破酒精柱顶，从而酒精柱借液面的表面张力将游标带下去。由此可知，游标只能降低不能升高，所以游标远离球部一端的示度，即是一定时间间隔内曾经出现过的最低温度。

调整方法：抬高最低温度表的感应部位，表身倾斜，使游标回到酒精柱的顶端并停止滑动，再把温度表放回原处，先放表身，后放球部。

3. 自记温度计

自记温度计是连续记录温度变化过程的变形温度计。仪器由感应部分、杠杆系统和钟筒三部分组成。感应部分的双金属片是由两条不同性质的金属（铜和铁）薄片沿平面焊接成双层的一块平板，温度变化时，它的两个组成部分因膨胀量不同引起翘曲。将双金属片做成弧形，并将它的一端固定不动，在温度改变时会引起其变形，其自由端将发

生移动，并通过杠杆系统放大传递给杠杆长臂上的笔尖，使装有甘油墨水的笔尖与钟筒上的记录纸相接触。钟筒的转动是靠装在钟筒下部的时钟装置驱动的，于是记录纸上得到连续的温度变化记录。特制的记录纸印有弧形坐标线，横坐标表示时间，纵坐标表示温度。

自计钟有“日计型”（钟转 1 周为 24h）和“周计型”（钟转 1 周为 7 天）。日计型纸每一小格代表 10min 或 15min，周计型的每一小格为 2h，温度刻度每小格为 1℃。

V　空气湿度的测定

【实验器材】

测定空气湿度的常用仪器有干湿球温度表、通风干湿表、毛发湿度计等。

【实验内容与步骤】

1. 干湿球温度表

由两支型号完全相同的温度表组成，一支球部包有湿纱布称为湿球，另一个称为干球。由于纱布上的水分不断蒸发，消耗的潜热使湿球及其附近的薄层空气降温。另一方面湿球与流经其周围的空气发生热量交换，当湿球因蒸发而散失的热量与从周围空气中获得的热量相平衡时，湿球温度维持稳定。干湿球产生温差，通过温差测得空气湿度的大小。

计算公式为

$$e = E_{t'} - AP(t - t') \qquad (41\text{-}1)$$

式中，e：绝对湿度，（空气水汽压）（Pa）；$E_{t'}$：湿球温度下的饱和水汽压（Pa）；t：干球温度（℃）；t'：湿球温度（℃）；P：当时大气压（Pa）；A：干湿球系数（1/℃）。

2. 通风干湿表

通风干湿表携带方便，精确度较高，是一种适于野外测定空气温湿度的良好仪器。通风干湿表两支温度表的球部由双层金属管保护，金属管表面镀镍，可将照到球部的太阳光及其他物体的辐射热反射出去。通风装置主要由通风器及三通管组成，通风器内有一个风扇，当风扇转动时，空气在双层金属保护套管下部吸入，绕温度表球部向上流动，经中央圆管从通风扇窗口排出，这样就可以使球部处于 2.5m/s 恒定速度的气流中。此外，温度表两侧各有一个金属保护板，仪器还附有贮水皮囊、防风罩及挂钩等。

读数前 4~5min 要润湿纱布。润湿纱布时，仪器必须保持垂直，先把水囊里的蒸馏水挤到离玻璃管口约 1cm 处，然后将玻璃管插入护管稍微停留，待纱布湿润后，使水回到水囊中。湿球纱布湿润后，启动通风干湿表把风扇发条上好，等 2~4min 左右，待风扇风速恒定时，直接读数，先读干球，后读湿球。

3. 毛发湿度计

毛发湿度计是自动记录相对湿度连续变化的仪器，它由三个部分组成。

（1）感应部分：一束脱脂人发（40~42 根），发束的两端用毛发压板固定于毛发支架上。

（2）传感放大部分：毛发束中央借小钩与仪器的传递放大部分相连接。传递部分由两个弯曲的杠杆即双曲臂组成。上曲臂带有平衡锤使毛发束总是处于稍微拉紧状态。上、

下曲臂杠杆分别借平衡锤和笔杆的重量得以轻轻保持接触。当相对湿度增大时，发束伸长，平衡锤下降，迫使笔杆抬起，笔尖上移；相对湿度减少时，发束缩短，平衡锤抬起，笔杆由于本身重量而往下落，笔尖下降，指示出相对湿度变小。

（3）自计部分：同自计温度计。

【思考与作业】

以组为单位到气象站观测场中参观各气候因子的测定仪器，并记录各气象因子的观测结果。

实验 42　土壤主要生态指标的测定

【实验目的】

土壤温度、水分状况和养分状况是土壤理化性质的重要方面。本实验通过测定土壤温度、土壤含水量和几种养分含量等指标，使学生掌握土壤测试仪器的使用方法要领，了解土壤环境对于陆生生物生命活动的极端重要性，为进一步认识植物与环境的相互关系提供基础信息。

Ⅰ　土壤温度的测定

【仪器与测定方法】

1. 曲管地温表法

曲管地温表是测定浅层（5~20cm）土壤温度使用最普遍的温度计。这种温度计是具有乳白玻璃插入式温标的水银温度表，表杆近球部弯曲成 135°的角，温度计下部的毛细管与玻璃套管之间充满棉花或草灰，其作用是消除温度表上部和埋在地下的部分因温度不同而引起套管内空气对流而产生的读数不准确性。一套曲管地温表包括 4 支不同长度的温度计，可供测定 5、10、15、20cm 深处的土壤温度。

2. 直管地温表法

在更深的土层中测定地温可使用直管地温表。直管地温表分内外两个部件，外部鞘筒由铁管或硬胶管制成，如由硬胶管制成的鞘筒，其下端连接一个传热良好的铜管；内部部件是一支装在特制铜套管中的水银温度表，表球部与套管之间充满铜屑，形成了良好的传导介质，并提高温度表的惯性。特制铜套管被系在链子上或镶在一木板下端，长度约与鞘筒等长，链子或木板上端与鞘筒帽相连接。每组直管地温表共 4~8 根，可供测定 0.2、0.4、0.6、0.8、1.2、1.6、2.4 和 3.2m 深处的土壤温度。

Ⅱ　土壤水分的测定

【实验器材】

土钻、土壤筛（孔径 1mm）、铝盒、分析天平、电热恒温烘箱、干燥器（内盛变色硅胶）。

【实验内容与步骤】

1. 土样的选取和制备

（1）风干土样：选取有代表性的风干土壤样品，压碎，通过 1mm 筛孔，混合均匀后备用。

（2）新鲜土样：在野外用土钻采有代表性的新鲜土样，刮去土钻中的上部浮土，将土钻中部所需深度处的土壤约 20g 捏碎后迅速装入已知准确质量的铝盒内，盖紧，装入木盒或其他容器，带回室内，将铝盒外表擦拭干净，立即称重。

2. 风干土样水分的测定

取铝盒在 105℃恒温箱中烘烤约 2h，移入干燥器内冷却至室温，称重，精确至 0.001g。用角勺将风干土样拌匀，舀取约 5g，均匀地平铺在铝盒中，盖好，称重，精确至 0.001g。将铝盒盖揭开，放在盒底下，置于已预热至 105±2℃的烘箱中烘烤 6~8h。取出，盖好，移入干燥器内冷却至室温，立即称重。风干土样水分的测定应做 2 份平行测定。

3. 新鲜土样水分的测定

将盛有新鲜土样的铝盒在分析天平上称重，揭开盒盖，放在盒底下，置于已预热至 105±2℃的烘箱中，烘烤 12h。取出，盖好，在干燥器中冷却至室温，立即称重。新鲜土样水分的测定应做 3 份平行测定。

4. 结果计算

$$\text{土壤含水量}=\frac{\text{烘干前铝盒及土样质量}-\text{烘干后铝盒及土样质量}}{\text{烘干后铝盒及土样质量}-\text{烘干空铝盒质量}}\times 100\%$$

Ⅲ　土壤有机质含量的测定

【器材和试剂】

1. 器材

硬质试管、油浴消化装置（包括油浴锅和铁丝笼）、可调温电炉、秒表、自动控温调节器、分析天平、移液管、烧杯、弯颈小漏斗、三角瓶、酸式滴定管（25mL）、洗瓶、胶头滴管等。

2. 试剂

（1）0.8000mol/L重铬酸钾标准溶液：称取经 130℃烘干的重铬酸钾（$K_2Cr_2O_7$，分析纯）39.2245g溶于水中，定容至 1L。

（2）0.2mol/L $FeSO_4$溶液：称取硫酸亚铁（$FeSO_4\cdot 7H_2O$，化学纯）56.0g溶于水中，加浓硫酸 5mL，稀释至 1L。此溶液需要用$K_2Cr_2O_7$标准溶液标定，$FeSO_4$与$K_2Cr_2O_7$完全反应的摩尔系数比为 6:1。

（3）邻菲罗啉指示剂：称取邻菲罗啉（分析纯）1.485g与$FeSO_4\cdot 7H_2O$ 0.695g，溶于 100mL水中。

（4）2-羧基代二苯胺（*O*-phenylanthranilic acid，又名邻苯氨基苯甲酸，$C_{13}H_{11}O_{12}N$）指示剂：称取 0.25g试剂于小研钵中研细，然后倒入 100mL小烧杯中，加入 0.1mol/L NaOH 溶液 12mL，并用少量水将研钵中残留的试剂冲洗入 100mL烧杯中，将烧杯放在水浴上加热使其溶解，冷却后稀释定容到 250mL，放置澄清或过滤，用其清液。

（5）硫酸银（Ag_2SO_4，分析纯），研成粉末。

（6）二氧化硅（SiO_2）。

【实验内容与步骤】

1. 样品制备

称取通过 0.149mm（100 目）筛孔的风干土样 0.1~1g（精确到 0.0001g），分别放入 6~8 支干燥的硬质试管中，用移液管准确加入 0.8000mol/L重铬酸钾标准溶液 5mL（如果土壤中含有氯化物需先加Ag_2SO_4 0.1g），再缓慢加入浓H_2SO_4 5mL，充分摇匀，管口盖上弯颈小漏斗。

2. 测定

（1）将置于铁丝笼中的 8~10 支试管（每笼有 1~2 个空白试管），放入温度为 185~190℃的石蜡油浴锅中，并控制电炉，使油浴锅内温度始终维持在 170~180℃，待试管内液体沸腾发生气泡时开始计时，煮沸 5min，取出试管，稍冷后擦净试管外部油液。

（2）冷却后，将试管内物质倾入 250mL三角瓶中，用水洗净试管内部及小漏斗，使三角瓶内溶液总体积达到 60~70mL，保持混合液中硫酸浓度为 2~3mol/L，然后加入 2-羧基代二苯胺指示剂 12~15 滴，此时溶液呈棕红色。用标准的 0.2mol/L $FeSO_4$滴定，滴定过程中不断摇动三角瓶，直至溶液的颜色由棕红经紫色变为暗绿（灰蓝绿色），即为滴定终点。如用邻菲罗啉指示剂，加指示剂 2~3 滴，溶液的变色过程中由橙黄—蓝绿—砖红色即为终点。记取$FeSO_4$滴定毫升数（V）。

每一批样品测定的同时，进行 1~2 个空白试验，即取 0.5g粉状二氧化硅代替土样，其他步骤与试样测定相同。记取$FeSO_4$滴定毫升数（V_0），取其平均值。

3. 计算

$$\text{土壤有机碳（g/kg）}=\frac{\frac{c\times 5}{V_0}\times(V_0-V)\times 1.1\times 3.0\times 0.001}{m\times k}\times 1000 \qquad (42\text{-}1)$$

式中，c：重铬酸钾标准溶液的浓度（mol/L）；V_0：空白滴定用去$FeSO_4$体积（mL）；3.0：1/4 碳原子的摩尔质量（g/mol）；1.1：氧化校正系数；m：风干土样质量（g）；k：将风干土换算成烘干土的系数。

$$\text{土壤有机质（g/kg）}=\text{土壤有机碳（g/kg）}\times 1.724 \qquad (42\text{-}2)$$

式中，1.724 为土壤有机碳换成土壤有机质的平均换算系数。

【注意事项】

1. 含有机质高于 50g/kg 的土样称取 0.1g；含有机质为 20~30g/kg 时，称土样 0.3g；少于 20g/kg 时称取 0.5g 以上。

2. 土壤中氯化物的存在可使结果偏高。因为氯化物也能被重铬酸钾氧化，所以盐土中有机质的测定必须防止氯化物的干扰，少量氯可加入少量Ag_2SO_4，使氯根沉淀下来。Ag_2SO_4的加入，不仅能沉淀氯化物，而且促进有机质分解。Ag_2SO_4的用量不能太多，约加 0.1g，否则生成$Ag_2Cr_2O_7$沉淀，影响滴定。

3. 必须在试管内溶液表面开始沸腾才开始计算时间。掌握沸腾的标准尽量一致，然后继续消煮 5min，消煮时间对分析结果有较大的影响，故应尽量保证记时准确。

4. 消煮好的溶液颜色，一般应是黄色或黄中稍带绿色，如果以绿色为主，则说明重铬

酸钾用量不足。在滴定时若消耗硫酸亚铁量小于空白用量的1/3，有氧化不完全的可能，应弃去重做。

Ⅳ 土壤中全氮、水解氮含量的测定

土壤中氮素绝大部分为有机的结合形态。无机形态的氮一般占全氮的 1%~5%。土壤有机质和氮素的消长，主要决定于生物积累和分解作用的相对强弱以及气候、植被、耕作制度等因素，特别是水热条件，对土壤有机质和氮素含量有显著的影响。

土壤全氮量的测定

测定土壤全氮量的方法主要可分为干烧法和湿烧法两类。湿烧法就是常用的凯氏定氮法。这个方法是丹麦人凯道尔（J. Kjeldahl）于 1883 年用来研究蛋白质变化的，后来被用来测定各种形态的有机氮。由于设备比较简单易得，结果可靠，为一般实验室所采用。下面介绍目前广泛采用的半微量凯氏法。

样品在加速剂的参与下用浓硫酸消煮，各种含氮有机化合物经过复杂的高温分解反应，转化为氨，与硫酸结合成硫酸铵。碱化后蒸馏出来的氨用硼酸吸收，以标准酸溶液滴定，求出土壤全氮含量（不包括全部硝态氮）。

包括硝态和亚硝态氮的全氮测定，在样品消煮前，需先用高锰酸钾将样品中的亚硝态氮氧化为硝态氮后，再用还原铁粉使全部硝态氮还原，转化成氨态氮。

在高温下硫酸是一种强氧化剂，能氧化有机化合物中的碳而分解有机质。

【器材和试剂】

1. 器材

消煮炉、半微量蒸馏装置、半微量滴定管（5mL）、凯氏瓶、弯颈小漏斗、长颈漏斗、移液管、三角瓶、分析天平、烧杯等。

2. 试剂

（1）10mol/L NaOH溶液：称取 420g工业用固体NaOH于硬质玻璃烧杯中，加蒸馏水400mL溶解，不断搅拌，冷却后倒入塑料试剂瓶，加塞，放置数日待Na_2CO_3沉降后，将清液虹吸入盛有 160mL无CO_2的水中，以去CO_2的蒸馏水定容至 1L。

（2）甲基红-溴甲酚绿混合指示剂：0.5g 溴甲酚绿和 0.1g 甲基红溶于 100mL 95%的乙醇中。

（3）20g/L H_3BO_3：20g H_3BO_3（化学纯）溶于 1L水中，每升H_3BO_3溶液中加入甲基红-溴甲酚绿混合指示剂 5mL，并用稀酸或稀碱调节至微紫红色，此时该溶液的pH应为4.8。指示剂使用前与硼酸混合，此试剂宜现配，不宜久放。

（4）混合加速剂：将 100g K_2SO_4、10g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$和 1g Se粉混合研磨，通过 80号筛充分混匀，储存于具塞瓶中。消煮时每毫升H_2SO_4加 0.37g混合加速剂。

（5）0.02mol/L硫酸标准溶液：量取 2.83mL H_2SO_4，加水稀释至 5000mL，然后用标准碱或硼砂标定之。

（6）高锰酸钾溶液：将 25g 高锰酸钾溶于 500mL 无离子水，储存于棕色瓶中。

（7）还原铁粉：磨细通过孔径 0.149mm（100 目）筛。

（8）1:1 的硫酸：硫酸与等体积水混合。

（9）辛醇。

【实验内容与步骤】

1. 样品制备

称取风干土样（通过 0.149mm 筛）1.000g。

2. 土样消煮

（1）不包括硝态氮和亚硝态氮的消煮：将土样送入干燥的凯氏瓶底部，用少量无离子水（0.5~1mL）湿润土样后，加入 2g 加速剂和 5mL 浓硫酸，摇匀，瓶口盖上弯颈小漏斗。将凯氏瓶倾斜置于 300W 变温电炉上，用小火加热，待瓶内反应缓和时（10~15min），加强火力使消煮的土液保持微沸，加热的部位不超过瓶中的液面，以防瓶壁温度过高而使铵盐受热分解，导致氮素损失。消煮的温度以硫酸蒸气在瓶颈上部 1/3 处冷凝回流为宜。待消煮液和土粒全部变为灰白稍带绿色后，再继续消煮 1h。消煮完毕，冷却，待蒸馏。在消煮土样的同时，做 2 份空白测定，除不加土样外，其他操作皆与测定土样相同。

（2）包括硝态和亚硝态氮的消煮：将土样送入干燥的凯氏瓶底部，加 1mL 高锰酸钾溶液，摇动凯氏瓶，缓缓加入 1:1 硫酸 2mL，不断转动凯氏瓶，然后放置 5min，再加入 1 滴辛醇。通过长颈漏斗将 0.50g（±0.01g）还原铁粉送入凯氏瓶底部，瓶口盖上弯颈小漏斗，转动凯氏瓶，使铁粉与酸接触，待剧烈反应停止时（约 5min），将凯氏瓶置于电炉上缓缓加热 45min（瓶内土液应保持微沸，以不引起大量水分丢失为宜）。待凯氏瓶冷却后，通过长颈漏斗加 2g 加速剂和 5mL 浓硫酸，摇匀。按上述（1）的步骤，消煮至土液全部变为黄绿色，再继续消煮 1h。消煮完毕，冷却，待蒸馏。在消煮土样的同时，做 2 份空白测定。

3. 氨的蒸馏

（1）蒸馏前先检查蒸馏装置是否漏气，并通过水的馏出液将管道洗净。

（2）待消煮液冷却后，用少量无离子水将消煮液全部转入蒸馏器内，并用水洗涤凯氏瓶 4~5 次（总用水量不超过 30~35mL）。若用半自动式自动定氮仪，不需要转移，可直接将消煮管放入定氮仪中蒸馏。

于 150mL 锥形瓶中，加入 20g/L 硼酸指示剂混合液 5mL，放在冷凝管末端，管口置于硼酸液面以上 3~4cm 处。然后向蒸馏室内缓缓加入 10mol/L NaOH 溶液 20mL，通入蒸汽蒸馏，待馏出液体积约 50mL 时，即蒸馏完毕。用少量已调节至 pH4.5 的水洗涤冷凝管的末端。

4. 滴定

用 0.01mol/L H_2SO_4或 0.01mol/L HCl标准溶液滴定馏出液，至馏出液由蓝绿色刚变为紫红色为止。记录所用酸标准溶液的体积（mL）。空白滴定所用酸标准溶液的体积，一般不得超过 0.4mL。

5. 计算

$$土壤全氮（N）含量（g/kg）=\frac{(V-V_0)\times c\times 14.0\times 0.001}{m}\times 1000 \quad (42\text{-}3)$$

式中，V：滴定试液时所用酸标准溶液的体积（mL）；V_0：滴定空白时所用酸标准溶液的体积（mL）；c：H_2SO_4或HCl标准溶液浓度（mol/L）；m：风干土样的质量（g）。

两次平行测定结果允许绝对相差：土壤含氮量大于 1.0g/kg 时，不得超过 0.005%；含氮在 1.0~0.6g/kg 时，不得超过 0.004%；含氮量小于 0.6g/kg 时，不得超过 0.003%。

【注意事项】

1. 对于微量氮的滴定还可以用另一种更灵敏的混合指示剂，即 0.099g溴甲酚绿和 0.066g甲基红溶于 100mL乙醇中。20g/L H_3BO_3指示剂溶液的配制：称取硼酸（分析纯）20g溶于约 950mL水中，加热搅动直至H_3BO_3溶解，冷却后，加入混合指示剂 20mL，混匀，并用稀酸或稀碱调节至紫红色（pH约为 5），加水稀释至 1L混匀备用。宜现用现配。

2. 一般应使样品中含氮量为 1.0~2.0mg，如果土壤含氮量在 2g/kg 以下，应称取土样 1g；含氮量在 2.0~4.0g/kg 时，应称 0.5~1.0g；含氮量在 4.0g/kg 以上时应称取 0.5g。

3. 硼酸的浓度和用量以能满足吸收NH_3为宜，大致可按每毫升 10g/L H_3BO_3能吸收氮（N）量为 0.46mg计算。例如，5mL 20g/L H_3BO_3溶液最多可吸收的氮（N）量为 5 × 2 × 0.46=4.6mg。因此，可根据消煮液中含氮量估计硼酸的用量，适当多加。

4. 在半微量蒸馏中，冷凝管口不必插入硼酸液中，这样可防止倒吸减少洗涤手续。但在常量蒸馏中，由于含氮量较高，冷凝管须插入硼酸溶液，以免损失。

土壤水解氮含量的测定（碱解扩散法）

土壤水解氮也称土壤有效氮，它包括无机态氮和部分有机物质中易分解的比较简单的有机态氮，它是氨态氮、硝态氮、氨基酸、酰铵和易水解的蛋白质氮的总和。测定水解氮可以了解一定时期（如一个生长季或一年）内土壤中氮素的供应水平，对于制定改土培肥规划、拟定合理施肥方案、确定田间施肥量和作物管理等都有重要参考价值。

本实验所述碱解扩散法是利用稀碱与土样在一定条件下进行水解作用，使土壤中易水解的有机态氮转化为氨气状态，并不断地扩散逸出，与土壤中原有的氨态氮一起由硼酸吸收，再用标准酸滴定，计算出水解性氮的含量。但此法测得的有效氮中不包括土壤中的硝态氮。

【器材和试剂】

1. 器材

土样筛（1mm）、电子天平、扩散皿、温箱、半微量滴定管、移液管等。

2. 试剂

（1）1mol/L NaOH 溶液：40g 化学纯 NaOH 溶于 1L 水中。

（2）碱性甘油：最简单的配法是在甘油中溶解几小粒固体 NaOH 即成。

（3）2%硼酸溶液（内含溴甲酚绿−甲基红指示剂）：将 20g H_3BO_3溶于 1L水中，加入溴甲酚绿−甲基红指示剂 10mL，并用稀NaOH（约 0.1mol/L）或稀HCl（0.1mol/L）调节至紫红色（pH 4.5）。

（4）溴甲酚绿−甲基红指示剂：0.5g 溴甲酚绿和 0.1g 甲基红溶于 100mL 95%酒精中。

（5）0.01mol/L HCl标准溶液：先配制 1.0mol/L HCl溶液，稀释 100 倍，用硼砂或 180℃下烘干的Na_2CO_3标定其准确的浓度。

【实验内容与步骤】

称取风干土样（通过 1mm 筛）1.00g，置于扩散皿外室，轻轻地旋转扩散皿使土壤均匀地铺平。取 2mL 2%硼酸指示剂放于扩散皿内室，然后在扩散皿外室边缘涂上碱性甘油，盖上毛玻璃，旋转数次，使皿边与毛玻璃完全粘合，再渐渐转开毛玻璃一边，使扩散皿外室露出一条狭缝，迅速加入 5.0mL 浓度为 1mol/L 的 NaOH，立即盖严，再用橡皮筋圈紧，使毛玻璃固定。随后放入 40±1℃恒温箱中，碱解扩散 24±0.5h 后取出。内室吸收液中的氨气用半微量滴定管盛 0.01mol/L HCl 标准溶液滴定（由蓝色滴到微红色）。在样品测定同时进行空白实验，矫正试剂和滴定操作中的误差。

结果计算按下式：

$$土壤水解氮含量（mg/kg）=（V-V_0）\times c\times 14.0\times 1000/m \qquad (42\text{-}4)$$

式中，V、V_0：土样测定和空白实验所用标准HCl的体积（mL）；c：标准酸的浓度（mol/L）；14.0：氮原子的摩尔质量；m：风干土土样质量（g）。

两次平行测定结果允许误差为 5mg/kg。

V 土壤全磷含量的测定

土壤全磷含量的高低，受土壤母质、成土作用和耕作施肥的影响很大。另外，土壤中磷的含量与土壤质地和有机质含量也有关系。黏性土含磷量多于砂性土，有机质丰富的土壤含磷量也较多。在土壤剖面中，耕作层含磷量一般高于底土层。本实验只做土壤全磷含量的测定（$HClO_4$-H_2SO_4法）。

用高氯酸分解样品，因为它既是一种强酸，又是一种强氧化剂，而且高氯酸的脱水作用很强，有助于胶状硅的脱水，并能与Fe^{3+}络合，在磷的比色测定中抑制硅和铁的干扰。硫酸的存在提高消化液的温度，同时防止消化过程中溶液蒸干，以利于消化作用的顺利进行。溶液中的磷与钼锑抗显色剂反应，生成磷钼蓝，用分光光度法进行定量测定。

【器材和试剂】

1. 器材

土壤样品粉碎机、土壤筛（孔径 1mm 和 0.149mm）、分析天平、高温可调电炉、分光光度计、玛瑙研钵、容量瓶、凯氏瓶、弯颈小漏斗、移液管、滴管、烧杯等。

2. 试剂

（1）4mol/L NaOH 溶液：16g NaOH 溶于 100mL 蒸馏水中，摇匀。

（2）2mol/L 硫酸溶液：吸取 6mL 浓硫酸，缓缓加入 80mL 水中，冷却后加水至 100mL。

（3）2,6-二硝基酚或 2,4-二硝基酚指示剂：称取 0.25g 二硝基酚溶于 100mL 水中。此指示剂的变色点约为 pH3.0，酸性时无色，碱性时呈黄色。

（4）5g/L 酒石酸锑钾溶液：称取酒石酸锑钾 0.5g 溶于 100mL 水中。

（5）硫酸钼锑储备液：量取 153mL 浓硫酸，缓缓加入到 400mL 水中，冷却。另称取经磨细的钼酸铵 10g 溶于温度约 60℃100mL 水中，冷却。然后将硫酸溶液缓缓倒入钼酸铵溶液中，再加入 5g/L 酒石酸锑钾溶液 100mL，冷却后，加水稀释至 1000mL，摇匀，储存于棕色试剂瓶中。

（6）钼锑抗显色剂：称取 1.5g 抗坏血酸（左旋，旋光度+21°~22°）溶于 100mL 钼锑储备液中。此溶液宜现用现配。

（7）磷标准储备液：准确称取经 105℃下烘干 2h 的磷酸二氢钾（分析纯）0.4390g，用水溶解后，加入 5mL 浓硫酸，转入 1L 容量瓶中，加水定容至 1L，该溶液含磷 100mg/L，放入冰箱可供长期使用。

（8）5mg/L 磷标准溶液：准确吸取 5mL 磷储备液，放入 100mL 容量瓶中，加水定容。该溶液现用现配。

（9）浓硫酸（H_2SO_4，分析纯，98%，$\rho = 1.84g/m^3$）。

（10）高氯酸（$HClO_4$，分析纯，70%~72%）。

【实验内容与步骤】

1. 土壤样品制备

取通过 1mm 孔径筛的风干土样在牛皮纸上铺成薄层，划分成许多小方格。用小勺在每个方格中提出等量土样（总量不少于 20g）于玛瑙研钵中研磨，使其全部通过 0.149mm 孔径筛。混匀后装入磨口瓶中备用。

2. 待测液的指标

准确称取风干样品 0.50g，精确到 0.0001g，置于 50mL 凯氏瓶（或 100mL 消化管）中，以少量水湿润后，加浓硫酸 8mL，摇匀后，再加 70%~72%高氯酸 10 滴，摇匀，瓶口上加一个弯颈小漏斗，置于电炉上加热消煮，至溶液开始转白后继续消煮 20min。全部消煮时间为 40~60min。在样品分解的同时做一个空白试验，即所用试剂同上，但不加土样，同样消煮得到空白消煮液。

将冷却后的消煮液倒入 100mL 容量瓶中（容量瓶中事先盛水 30~40mL），用水冲洗凯氏瓶（用水应根据少量多次的原则），轻轻摇动容量瓶，待完全冷却后，加水定容。静置过夜，次日小心吸取上层澄清液进行磷的测定；或者用干的定量滤纸过滤，将滤液接受在 100mL 干燥的三角瓶中待测定。

3. 测定

吸取澄清液或滤液 5mL 注入 50mL 容量瓶中，用水稀释至 30mL，加二硝基酚指示剂 2 滴，滴加 4mol/L NaOH 溶液直至溶液变为黄色，再加 2mol/L 硫酸 1 滴，使溶液的黄色刚刚褪去。然后准确加入 5mL 钼锑抗显色剂，再加水定容 50mL，摇匀，30min 后，用 700nm 波长进行比色，以空白试验所得溶液为参比。

4. 标准曲线的绘制

分别准确吸取 5mg/L 磷标准溶液 0、1、2、4、6、8、10mL 于 50mL 容量瓶中，用水稀释至 30mL，再加空白试验定容后的消煮液 5mL，加二硝基酚指示剂 2 滴，滴加 4mol/L NaOH 溶液直至溶液变为黄色，再加 2mol/L 硫酸 1 滴，使溶液的黄色刚刚褪去（即调节 pH 为 3）。然后准确加入 5mL 钼锑抗显色剂，摇匀，加水定容，即得含磷（P）量分别为 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mg/L 的标准溶液系列。摇匀，放置 30min 后，在波长 700mm 处，测定其吸光度。以吸光度为纵坐标、磷浓度（mg/L）为横坐标，绘制标准曲线。

5. 计算

$$土壤全磷(P)含量(g/kg) = \rho \times \frac{V_1}{m} \times \frac{V_2}{V_3} \times 0.001 \times \frac{100}{100-H} \tag{42-5}$$

式中，ρ：从标准曲线上查得待测样品溶液中磷的质量浓度（mg/L）；m：土样质量（g）；V_1：样品制备溶液的体积（mL）；V_2：显色的溶液体积（mL）；V_3：吸取滤液的体积（mL）；$\frac{100}{100-H}$：将风干土变换为烘干土的转换因数；H：风干土中水分含量百分数。

【思考与作业】

土壤样品的采集过程中，应注意哪些问题才能使样品具有充分的代表性？

实验 43　水分胁迫对植物生理功能的影响

【实验目的】

水是影响陆生植物生长的主要生态因子。当水分亏缺时，植物的形态和生理生化特征都可能发生改变。形态方面主要表现在根系发育受到影响，根长、根数和重量明显减少，根系活力降低；茎叶生长缓慢；生殖器官的发育受阻。生理生化方面主要表现为细胞膜的透性增强，细胞内的溶质外渗，相对电导率增大；细胞内蛋白质分子变性凝固且蛋白质合成受阻；酶系统发生紊乱；叶片气孔关闭，CO_2进入量减少，光合作用下降，同化产物积累减少。

本实验通过测定叶细胞膜透性、根系活力、脯氨酸含量、脱落酸含量等生理生化指标在植物受水分胁迫前后的变化，从生理生化角度说明植物对水分胁迫的反应特点，并为筛选适用于干旱早期诊断的指标提供依据。

Ⅰ　质膜透性的测定

植物细胞与外界环境发生的物质交换都必须通过质膜进行。各种不良环境因素对细胞的影响往往首先作用于这层由类脂和蛋白质所构成的生物膜。极端温度、干旱、盐渍、重金属（如Cd^{2+}等）和大气污染物（如SO_2、HF、O_3等）都会使质膜受到不同程度的损伤，而往往表现为膜透性增大，细胞内部分电解质外渗。因此，质膜透性的测定常作为植物抗性研究的一个生理指标。测定质膜透性变化最常用的方法是测定组织外渗液的电导率变化，外渗液电导率的增大可反映质膜受损伤的程度。

【实验器材】

电导仪、小烧杯、带十字头的小玻璃棒、搪瓷盆、纱布、刀片、水浴锅、量筒、分析天平、真空干燥器、真空泵、真空压力表、恒温设备、摇床等。

【材料和试剂】

（1）取 10g 小麦（*Triticum aestivum*）种子，吸水膨胀，萌动后移到 2 个蒙着塑料窗纱的杯上，杯中充以 1/2 Hoagland 营养液，让根穿过网孔垂直伸入水中，培养 1 周后，即可取用。

（2）将每个培养杯中的幼苗分成 2 份，分别放在：①盛有 25mL 1/2 Hoagland 营养液（对照组）；②25mL1/2 Hoagland 营养液+10g PEG（处理组）（PEG 最终浓度为 400g/L）的小烧杯中，将根系浸入溶液中。每种溶液做 2 个重复，处理 24h，自然光照。

（3）Hoagland 营养液组成（见实验 38）。

（4）去离子水。

【实验内容与步骤】

（1）选取叶龄、部位相同的小麦叶片，包在湿纱布内，置于带盖的搪瓷盆中。用自来水轻轻冲洗叶片，除去表面污物，再用去离子水冲洗 1~2 次，用干净纱布轻轻吸干叶片表面水分，然后保存在湿纱布中，以防叶片失水。可用刀片将叶片切成 1cm 长段。

（2）按甲、乙两组分别称取样品 1g，每组做 3~4 个平行样，将样品放入小玻璃杯中，用带十字头的小玻璃棒轻轻压住材料，准确加入 20mL 去离子水，浸没样品。

（3）甲组样品放入真空干燥器中，用真空泵反复抽放气 3~4 次，除去水与叶表面之间和细胞间隙中的空气，使叶组织内电解质易渗出。为使减压条件一致，最好接一个真空压力表，将压力控制在 400~500mmHg。减压渗透 0.5h 后可恢复常压，在 20~30℃温度条件下振荡、保温 2~3h。

（4）乙组样品置沸水浴中煮沸 10~15min，以便杀死组织，使细胞膜变成全透性。静置冷却，最后用去离子水精确地补足至 20mL。

（5）将甲、乙两组样品的组织外渗液分别倾入洁净的小烧杯中，用电导仪测出电导率，其中，甲组外渗液测得结果记作 S1，乙组外渗液测得结果记作 S2。

按照以上操作，对照组和 PEG 处理组分别进行。

（6）计算

电解质的相对外渗率（%）=甲组外渗液电导率（μS/cm）/乙组外渗液电导率（μS/cm）×100，即

$$L(\%) = S1/S2 \times 100\% \quad (43\text{-}1)$$

电解质的相对外渗率（也称作相对电导率）的大小表示细胞膜受伤害的程度。

由于对照组叶片也有少量电解质外渗，故可按下式计算由于 PEG 处理引起的干旱胁迫而产生的外渗，称为伤害度（或伤害性外渗）

$$\text{伤害度}(\%) = (L_t - L_c)/(1 - L_c) \times 100\% \quad (43\text{-}2)$$

式中，L_t：处理组叶片的电解质的相对外渗率；L_c：对照叶片的电解质的相对外渗率。

在电解质的相对外渗率的测定中一般应用去离子水，若制备困难可用普通蒸馏水代替，但需要设一空白试管（去离子水或蒸馏水作空白），测定样品时同时测定空白电导率 Sc，按下式计算电解质的相对外渗率，即

$$L(\%) = (S1 - Sc)/(S2 - Sc) \times 100\% \quad (43\text{-}3)$$

Ⅱ　根系缺水程度的测定——TTC 还原法

【实验器材】

722 型分光光度计、水浴锅、烧杯、移液管、研钵、容量瓶、具塞试管（10mL）、分析天平、量筒、漏斗、滤纸等。

【材料和试剂】

1. 实验材料

同“质膜透性的测定”所用材料。

2. 试剂

（1）0.4% TTC 溶液：准确称取 TTC（氯化三苯基四氮唑）0.4g，溶于少量蒸馏水中，定容至 100mL。

（2）1mol/L 硫酸：用量筒量取相对密度为 1.84 的浓硫酸 55mL，边搅拌边加入盛有 500mL 蒸馏水的烧杯中，冷却后稀释至 1000mL。

（3）0.1mol/L 磷酸缓冲液（pH=7.5）。

（4）乙酸乙酯。

（5）连二亚硫酸钠（$Na_2S_2O_4$，为强还原剂，俗称保险粉）。

（6）石英沙（SiO_2）。

【实验内容与步骤】

1. 样品的制备

取 0.1g的小麦根尖（对照组和处理组分别进行），迅速投入有以下反应液的具塞试管中，5mL 0.4% TTC和 5mL 0.1mol/L pH7.5 的磷酸缓冲液（两种试剂以等体积混合，用量可根据鲜根数量多少而定），使根完全浸入反应液中，将试管塞塞紧，在 37℃水浴中避光反应 3h。向试管中加入 2mL 1mol/L的H_2SO_4以终止反应。空白试验先加 2mL 1mol/L的H_2SO_4再加入小麦根尖，最后加入 5mL 0.4% TTC和 5mL 0.1mol/L pH7.5 的磷酸缓冲液，其他操作相同。

TTC 加磷酸缓冲液后要避光，最好临时配制使用，配成后在暗处保存，否则见光会变红，影响反应的准确性。

提取根组织时，先取出根，用滤纸吸干试液，剪碎，加入 3~5mL 乙酸乙酯和少许石英砂，在研钵中研磨，以提取还原型的 TTC，即三苯甲腙（TTCH）。将红色抽提液转移至 10mL 容量瓶中，残渣再用乙酸乙酯抽提 2~3 次，至无红色为止。合并抽提液，用乙酸乙酯定容。

2. 标准曲线的绘制

取 0.4% TTC溶液 0.2mL放入 10mL容量瓶中，加少许$Na_2S_2O_4$粉摇匀后立即产生红色的TTCH。再用乙酸乙酯定容至刻度，摇匀。然后分别取此液 0.25mL、0.50mL、1.00mL、1.50mL、2.00mL置 10mL容量瓶中，用乙酸乙酯定容至刻度，即得到含TTCH 25μg、50μg、100μg、150μg、200μg的标准比色系列，以乙酸乙酯作参比，用 722 型分光光度计于 485nm 处比色测定，并绘制标准曲线。

3. 样品测定

取待测样品，按绘制标准曲线的步骤，测其吸光度，并根据标准曲线计算三苯甲腙（TTCH）的含量，即 TTC 还原量。

4. 计算

将所得数据代入下式中，求出 TTC 还原强度。

TTC 还原强度（μg/g/h）= TTC 还原量（μg）/ [根重（g）× 时间（h）]

Ⅲ　叶片游离脯氨酸含量的测定

【实验器材】

可见分光光度计、离心机、电子天平、水浴锅、研钵、容量瓶、大试管、具刻度试管、滴管等。

【材料和试剂】

1. 实验材料

同“质膜透性的测定”所用材料。

2. 试剂

（1）2.5%酸性茚三酮：将 1.25g 茚三酮溶于 30mL 冰醋酸和 20mL 6mol/L 磷酸中，搅拌加热（70℃）溶解，冷却后储于冰箱 4℃保存。

（2）3%磺基水杨酸：3g 磺基水杨酸加蒸馏水溶解后，定容至 100mL。

（3）10μg/mL 脯氨酸标准母液：精确称取 10mg 脯氨酸，倒入小烧杯内，用少量蒸馏水溶解，再倒入 100mL 容量瓶中，加蒸馏水定容至刻度（为 100μg/mL 脯氨酸母液），再吸取该溶液 10mL，加蒸馏水稀释定容至 100mL，即为 10μg/mL 脯氨酸标准液。

（4）冰醋酸。

（5）甲苯。

【实验内容与步骤】

1. 游离脯氨酸提取

取 0.05~0.5g 小麦叶片（对照组和处理组分别进行），用 3%磺基水杨酸溶液研磨提取，磺基水杨酸的最终体积为 5mL。匀浆液转入玻璃离心管中，在沸水浴中浸提 10min。冷却后，以 3000r/min 离心 10min，取上清液待测。

2. 标准曲线制作

在 1~10μg/mL 脯氨酸浓度范围内制作标准曲线。取标准溶液各 2mL，加入 2mL 3%磺基水杨酸、2mL 冰乙酸和 4mL 2.5%酸性茚三酮溶液，置沸水浴中显色 60min。冷却后加入 4mL 甲苯萃取红色物质。静置后取甲苯相测定 520nm 波长处的吸收值，依据脯氨酸用量和相应吸收值绘制标准曲线。

3. 样品测定

取 2mL 上清液，加入 2mL 水，2mL 冰乙酸和 4mL 2.5%茚三酮溶液，参照标准曲线程序进行显色、萃取和比色。

4. 计算

从标准曲线中查出测定液中脯氨酸的质量，按下列计算样品中脯氨酸在叶片中的质量分数。

$$\text{样品中脯氨酸的质量分数}(\mu g/g) = (C \times V) / (a \times m) \quad (43\text{-}4)$$

式中，C：提取液中脯氨酸的质量（μg），由标准曲线求得；V：提取液总体积（mL）；a：测定时所吸取的体积（mL）；m：样品质量（g）。

【注意事项】

配制的酸性茚三酮溶液仅在 24h 内稳定，因此最好现用现配。茚三酮的用量与脯氨酸的含量相关。一般当脯氨酸含量在 10μg/mL 以下时，显色液中茚三酮的浓度要达到 10mg/mL 才能保证脯氨酸充分显色。

干样品中脯氨酸含量的测定也可采用此法。

Ⅳ 脱落酸（ABA）的测定

【实验器材】

灭菌锅、低温冰箱、温箱、通风橱、离心机、电子天平、酶标分光光度计、C_{18}胶柱、96 孔微孔板、氮气钢瓶、研钵、具塞试管等。

【材料和试剂】

1. 实验材料

同“质膜透性的测定”所用材料。

2. 试剂

（1）50mmol/L $NaHCO_3$缓冲液，pH9.6。

（2）50mmol/L Tris-HCl缓冲液（内含 150mmol/L NaCl和 1mmol/L $MgCl_2$），pH7.8，此液为测定缓冲液（TBS）。

（3）在 1L TBS 中加 1g 明胶，高压灭菌（120℃）30min。

（4）稀释 1mg 冰冻干燥的兔抗鼠免疫球蛋白（RAMIG）于 20mL 试剂（1）中。

（5）以试剂（1）溶解冰冻干燥的克隆抗体（mAb），使 ABA 的 mAb 浓度为 0.01mg/mL。

（6）以试剂（3）溶解碱性磷酸酯酶（AP）–标记激素液，酶标液的最终稀释倍数为 1：500。酸性植物激素（IAA、GA4 和ABA）可用碳二亚胺（EDC）法直接将羧基连接到AP的—NH_2上。

（7）以试剂（1）溶解对硝基苯磷酸酯（1mg/mL），该试剂在使用前配制。

（8）重氮甲烷的制备：取 3 只 15mL带盖试管A、B、C，在通风橱内于A管中分别加入 1mL 40%KOH（m/V）、5mL乙醚和 500mg亚硝基甲基脲（$CH_3NHCONH_2$ Sigma N-0132），在盐冰浴上搅拌 10min。待乙醚层呈黄色（OD_{410}约为 3 最佳）时，吸取上层含重氮甲烷的乙醚溶液加入试管B，加数粒KOH结晶静置 30min，将上清液吸入试管C。C管中的溶液可直接使用或于低温（–20℃）下保存 1 周。

亚硝基甲基脲有致癌作用，操作时应注意安全。

（9）0.2mol/L 乙酸。

（10）5mol/L KOH。

（11）80%甲醇（内含 10mg/L 的丁羟甲苯）。

（12）70%甲醇。

（13）乙醚。

（14）丁羟甲苯（BHT）。

（15）乙酸乙酯。

【实验内容与步骤】

1. 植物样品中激素的提取

准确称取鲜重为 100mg 的小麦叶片（对照组和处理组分别进行），置于预冷（0℃）的研钵中，加入 1mL 80% 的甲醇（内含 10mg/L 的丁羟甲苯）研磨或匀浆，静置片刻后将上清液吸入离心管中，残渣再加 1mL 80% 甲醇研磨一次，然后一起倒入离心管中，加入 1mL 80% 甲醇液洗涤研钵后倒入离心管，离心（离心力为 5000g，10min，4℃），取出上清液于 –20℃保存或用于亲酯色素的分离。

以上操作过程应在弱光下进行。

2. 用C_{18}胶柱去除亲酯色素

C_{18}胶柱（Sep-Pak C_{18} Cartridge，Water公司产品）可根据样品溶质极性的不同，分离水溶液或极性较大的水和有机溶剂的混合物。当C_{18}胶柱用于含水样品分离时，应先用 2mL可与水混合的溶剂如甲醇、乙腈等平衡，然后用与样品浓度相等的溶剂湿润胶柱，洗脱样品，最后可用非极性的溶剂去除残留在胶柱上的污染物。具体过程如下：

（1）以 5mL甲醇平衡C_{18}胶柱，然后去除甲醇；

（2）以 5mL 70% 甲醇漂洗C_{18}胶柱，去除漂洗液；

（3）加样（一般一次不超过 5mL 80%甲醇粗制液）；

（4）将 5mL 80% 甲醇通过C_{18}胶柱，再用 5mL乙醚通过C_{18}胶柱洗去亲酯色素，以便C_{18}胶柱的重新使用；

（5）重复步骤（2）~（4），根据对样品纯度要求，一般C_{18}胶柱可反复使用 10 次左右。

3. 植物样品的甲酯化

取适量（100μL左右）经过C_{18}胶柱的提取液，于试管内氮气吹干，然后加入 100μL 乙酸乙酯或甲醇重新溶解，再加入过量（100~200μL）的重氮甲烷直至样液呈浅黄色，于冰浴反应 10min，然后用 100μL 0.2mol/L乙酸的甲醇液破坏过量的重氮、甲烷（至黄色消失为止）。以氮气吹干样液，加少量甲醇（最终浓度不超过 10%）和测定缓冲液（TBS），溶解后即可用于测定。

4. 样品的测定

（1）将 RAMIG [试剂（4）]加入到聚苯乙烯微量滴定板（96 孔微孔板）微孔中，置于 4~10℃过夜，然后倒弃溶液，用自来水漂洗一次。

（2）加 0.2mL 稀释的 mAb [试剂（5）]，于 4~10℃反应 24h。

（3）倒弃清液，用自来水漂洗 2 次。

（4）于各孔加入 0.05mL TBS，0.1mL 不同浓度的标准激素液或植物样品液。在黑暗处于 4~10℃反应 1h。

（5）加 0.05mL 稀释酶标液，混匀，于 4~10℃反应 3h。

（6）倒弃清液，用自来水漂洗 2 次。

（7）加 0.2mL 对硝基苯磷酸酯[试剂（7）]，于 37℃保温 1h。

（8）以 0.05mL 5mo1/L KOH 终止反应。

（9）用酶标分光光度计在 410nm 处测定各孔的光密度。

某种植物激素浓度与测定光密度间关系经线性化，即求激素浓度的对数值

$\ln\left(\frac{B/B_0}{1-B/B_0}\right)$（其中$B_0$为不加激素时的结合率，$B$为样品液的结合率）；其反对数值，即为样品中激素的含量。

用于 ELISA 测定的内源植物激素提取程序可总结如下：

预冷的植物材料研碎提取（3mL 80%甲醇，含 10mg/L 丁羟甲苯）⟶稀释样品液甲醇浓度至 70%，过C_{18}胶柱⟶以氮气吹干⟶加TBS溶解⟶ABA含量测定。

【思考与作业】

水分胁迫条件下，叶片游离脯氨酸与脱落酸含量的变化说明了什么问题？

实验 44　渗透胁迫对种子萌发的影响

【实验目的】

渗透胁迫对植物生长发育的各个阶段如种子萌发、幼苗生长、成株生长等都有着不同程度的影响。不同种类的植物受其影响的程度也各不相同。本实验主要观察不同浓度的渗透液（PEG6000）对植物种子萌发过程的影响。通过本实验使学生了解渗透胁迫对植物（种子萌发）的影响；掌握种子萌发过程中发芽率、发芽势、发芽指数等各项指标的观察和计算方法；各项指标在渗透胁迫条件下的变化趋势；绘制渗透液浓度和生长指标相关曲线。

【实验器材】

培养皿（10cm × 2cm）、滤纸（直径为 9cm 的定性滤纸）、电热恒温箱、电子天平、400mL 烧杯、200mL 容量瓶、10mL 移液管、毫米刻度尺、玻璃棒、镊子。

【材料和试剂】

1. 实验材料

选择饱满、大小相当的克氏针茅（*Stipa krylovii*）种子（由于克氏针茅种子存在休眠，最好取储藏过半年后的种子）。

2. 试剂

（1）浓度为 50、100、150、200g/L 的 PEG 试验液，溶质为 PEG6000，溶剂为蒸馏水。

（2）50%浓硫酸：27.2mL 98%的浓硫酸，缓慢倒入 50mL 蒸馏水中。

（3）5%次氯酸钠。

【实验内容与步骤】

1. 预处理

（1）种子的预处理：用 50%的浓硫酸浸泡种子 20min，再用 5%的次氯酸钠溶液浸泡 20min，然后用无菌水冲洗 5 次。

（2）器皿准备：取培养皿 30 套，分别按以下不同浓度的 PEG 处理贴好标签。

PEG：0、50、100、150、200g/L。

在每个培养皿底部平铺两张滤纸。每个处理重复 6 次，分别标记为 1、2、3、4、5、6。

2. 种子的培养

挑选籽粒大小相当的克氏针茅种子播种于铺有滤纸的培养皿（发芽床）内，分别加入不同浓度的 PEG 渗透液 10mL（50 粒/皿），各浓度处理均设 6 个重复，然后将培养皿置于恒温箱中，在 25℃避光条件下培养，直到连续 2 天没有新发芽的种子出现为发芽结束。培养期间，每天采用重量法补充蒸馏水，以维持溶液渗透势的恒定（加蒸馏水时最好用滴管滴入，防止加入过猛，冲乱种子）。如果在发芽床内有 5%以上的种子发霉，则应该进行消毒或更换新床。

3. 实验记录

在种子萌发 3 天后，逐日观察记录正常萌发种子数、不萌发种子数及腐烂种子数。第一次观察后取正常种子测其生长指标，之后每次观察后将正常发芽种子和腐烂种子取出弃掉。观察时间为发芽后 1~2 周。将观察结果填入表 44-1 中。

表 44-1　克氏针茅发芽情况记录

PEG 浓度/（g/L）	重复样	时间/天											
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
0	1												
	2												
	3												
	4												
	5												
	6												
50	1												
	2												
	3												
	4												
	5												
	6												
100	1												
	2												
	3												
	4												
	5												
	6												
150	1												
	2												
	3												
	4												
	5												
	6												
200	1												
	2												
	3												
	4												
	5												
	6												

4. 计算

（1）发芽率、发芽势和发芽指数的计算：种子发芽试验结束后，要根据检查和记录结果计算种子的发芽势和发芽率。

$$发芽率（\%）=发芽的种子数/供试验种子数\times100\%$$

其计算公式为

$$G_r = \sum G_t / T \times 100 \quad (44\text{-}1)$$

式中，G_r：发芽率（%）；G_t：在t日的发芽数（个）；T：供试种子总数（个）。

发芽势（%）= 规定天数内发芽种子数/供试验种子数×100%

种子发芽势是判断种子质量优劣、出苗整齐与否的重要指标，也与幼苗强弱和产量有密切的关系。发芽势高的种子，出苗迅速，整齐健壮。克氏针茅种子发芽势的规定天数为 3 天。

发芽指数

$$G_r = \sum (G_t / D_t) \quad (44\text{-}2)$$

式中，G_i：发芽指数；G_t：在t日的发芽数（个）；D_t：相应的发芽天数（d）。

根据表 44-1 的数据，分别计算发芽率、发芽势和发芽指数，将计算结果填入表 44-2。

（2）生理指标的测定：种子萌发过程中的生理指标主要包括芽长、总长。发芽结束后，用镊子轻轻将其取出，用滤纸吸干后，再用刻度尺分别测量芽长和总长。以上各量均取平均值，将结果记入表 44-3。

表 44-2　克氏针茅种子萌发中的发芽率、发芽势及发芽指数计算结果

指标	PEG 浓度/（g/L）				
	0	50	100	150	200
发芽率/%					
发芽势/（个/天）					
发芽指数					

表 44-3　克氏针茅种子萌发中的生长指标测定结果

指标	PEG 浓度/（g/L）				
	0	50	100	150	200
发芽个数/个					
芽长/cm					
总长/cm					

根据观测和测定计算的结果，分析种子萌发过程中各指标在不同渗透胁迫条件下的变化，了解渗透胁迫对种子萌发的影响。

【思考与作业】

1. 做渗透胁迫实验时，在预处理种子中为什么要用硫酸和次氯酸钠处理种子？
2. 试分析渗透胁迫对种子萌发的影响。

实验 45　种群在有限环境中的 Logistic 增长

【实验目的】

通过对紫背浮萍种群增长的观察，使学生了解在有限环境下种群的增长方式，理解

环境对种群增长的限制作用，学习并掌握 Logistic 方程参数估计和曲线拟合的方法。

【实验原理】

自然条件下的种群不可能无限制的增长。当种群增长到一定阶段，随密度上升，空间、资源或其他生活条件的限制使得种内竞争增加，种群出生率下降，死亡率上升，导致种群实际增长率的下降，直至种群不再增长甚至数量下降。种群在有限环境中的增长称为 Logistic 增长，可用 Logistic 增长方程来进行描述：

$$dN/dt = rN[(K-N)/K] \tag{45-1}$$

其积分式为

$$N_t = K/(1+e^{a-rt}) \tag{45-2}$$

式中，K 为环境容纳量，即种群数量的最大值；N 为种群的数量；e = 2.718 28 是一个常数，即自然对数的底；r 为种群的瞬时增长率；t 为时间。

【器材与材料】

1. 器材

光照培养箱、50mL 锥形瓶、量筒、移液器、电子天平、烧杯、坐标纸、镊子等。

2. 材料

浮萍科（Lemnaceae）的多根紫背浮萍（*Spirodela polyrrhiza*），为短日照类型。

【实验内容与步骤】

1. 配制培养液

紫背浮萍的最佳培养液——Datko 培养液配方见表 45-1。

表 45-1 Datko 培养液配方

微量元素	终浓度/（μmol/L）	大量元素	终浓度/（μmol/L）
H_2BO_3	33	$MgSO_4$	240
EDTA-K_2H_2	20	$Ca(NO_3)_2$	840
EDTA-$FeNH_4$	34	KNO_3	600
$MnCl_2$	8	KH_2PO_4	240
EDTA-$ZnNa_2$	1.6	$Mg(NO_3)_2$	240
EDTA-$CuNa_2$	2		
$CoSO_4$	3		
EDTA-Na_2	11		
$CaCl_2$	150		
KCl	150		
Na_2MO_4	18.3		

2. 浮萍的培养

紫背浮萍植株培养在光强约为 45mL/(μmol·cm)的长日照（16h 光照和 8h 黑暗）条件

下，以阻止开花。培养温度白天24~28℃，晚上20~24℃。每周更换一次培养液。

3. 确定浮萍种群的最初密度

在50mL锥形瓶中加入25mL的培养液，用镊子放入4片浮萍的原叶体，使用透气薄膜封好瓶口，放入光照培养箱中进行培养。

4. 定时观察计数

每隔24h观察一次，并记录下浮萍原叶体的数目。此期间不必更换培养液，只需补充水分至原有水平。观察到种群数量不再增加，保持稳定为止。

5. Logistic方程参数的估计（确定环境容纳量K值）

（1）目测法：在坐标纸上描点，判断种群增长的总趋势，目测出环境容纳量K值。

（2）平均法：利用到达平衡点开始的一天及以后几天的数据，计算平均值。

（3）三点法：取相同时间间隔的3个观察值，应用下列公式计算K值

$$K=\frac{2N_1N_2N_3-N_2^2(N_1+N_3)}{N_1N_3-N_2^2} \tag{45-3}$$

式中，N_1、N_2、N_3分别为时间间隔相等的三个种群数量值，要求时间间隔尽可能大一些。求出K值后，将Logistic方程变形为

$$(K-N)/N=\mathrm{e}^{a-rt} \tag{45-4}$$

两边取对数，即为

$$\ln(K-N)/N=a-rt \tag{45-5}$$

设$y=\ln(K-N)/N$，$b=-r$，$x=t$。则可将Logistic方程写为$y=a+bx$。利用直线回归的统计方法求得参数a和b，把求得的值（a、r、N）代入Logistic方程，则得到理论值。将理论值与实际值进行显著性检验，确定无显著性差异，则Logistic方程拟合成立。

【思考与作业】

1. Logistic方程增长模型能否作为种群增长普遍性模型？
2. 试以另一种植物为实验材料，设计实验拟合种群增长的Logistic方程并进行检验。

实验46　植物种群的空间分布格局

【实验目的】

通过本实验，使学生认识并理解不同种群个体在空间分布上表现的不同类型，学习并掌握判断种群空间分布格局的方法。

【实验原理】

种群的空间分布格局，是指组成种群的个体在其生活空间中的位置状态或布局。植物种群的空间分布格局一般有三种类型：随机分布（random）、均匀分布（uniform）和集群分布（clumped）。

植物种群的空间分布格局主要取决于种群个体间的相互作用和各环境因子的综合作用。

判断植物种群空间分布格局的方法很多。本实验仅介绍最常用的方差/平均值比率法。

【实验内容与步骤】

（1）选择合适的草地群落，用绳子和铁钉圈起一个 1m×1m 的样方，再将其分割为 25 个 0.2m×0.2m 的小样方。对目标植物种群进行调查计数，并将调查数据填入表 46-1 中。

表 46-1 调查数据记录表

每个样方生物个数/x	样方数/f	fx	fx^2
0			
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
总计	$N=\sum f=$	$\sum fx=$	$\sum fx^2=$

（2）利用表中数据进行计算

$$\bar{x}=\frac{\sum fx}{\sum f} \tag{46-1}$$

$$S^2=\frac{\sum fx^2-\frac{\left(\sum fx\right)^2}{\sum f}}{\sum f-1} \tag{46-2}$$

（3）用 t 检验，检验 $S^2/\bar{x}$ 对 1.0 的偏离显著程度

$$t=\frac{S^2/\bar{x}-1}{\sqrt{\frac{2}{\sum f-1}}} \tag{46-3}$$

由 t 值表查出 $t_{\sum f-1,0.05}$ 的值，确定 $S^2/\bar{x}$ 对 1.0 的偏离显著性程度，从而判断种群属于何种分布格局。

若 $|t|>t_{\sum f-1,0.05}$，则可认为 $S^2/\bar{x}$ 对 1.0 的偏离具显著性；

若 $S^2/\bar{x}\approx 1$，表示种群为随机分布；

若 $S^2/\bar{x}>1$，表示种群为集群分布；

若 $S^2/\bar{x}<1$，表示种群为均匀分布。

【思考与作业】

1. 所调查的植物种群的分布格局为哪种类型？试分析其形成原因。

2. 增大或减少样方数会对实验结果产生什么样的影响？

实验 47　蚕豆根尖细胞微核试验在环境监测中的应用

【实验目的】

通过本实验，了解环境污染对生物遗传物质的改变作用，增强环境保护意识，同时掌握微核实验技术，并在显微镜下观察和区分细胞有丝分裂相的不同时期。

【实验原理】

细胞中的染色体在复制过程中，经常会发生一些断裂，这些断裂在一般情况下能自己愈合，恢复原状，这样细胞就能恢复正常的生活。如果细胞受到外界污染物或诱变剂的干扰，染色体断裂的愈合就会受阻，甚至增加断裂，断裂下来的染色体由于缺少着丝粒，不能移到两极，而停留在细胞质中。当完成细胞分裂形成新的细胞核时，这些片段就自己形成大小不等的小核，叫做微核，因此，在细胞分裂后观察统计微核的数量，就可以测量环境污染的程度或样品突变性的强弱。

蚕豆（*Vicia faba*）根尖微核试验在 1986 年已被中国国家环境保护总局列为一种环境生物测试的规范方法，它作为一种环境变异的测试手段，在我国不少地区的环保部门和医疗卫生系统中都有广泛的应用。蚕豆根尖微核试验与染色体畸变试验同样具有准确、快速、操作简便、有明显剂量–效应关系，适合大量样品检测等特点。美国国家环境保护总局也肯定了蚕豆根尖微核试验在环境突变性检测中的作用，对许多环境致癌物都作了标准化的试验，建立了庞大的数据库，并建议在全世界范围内推广。

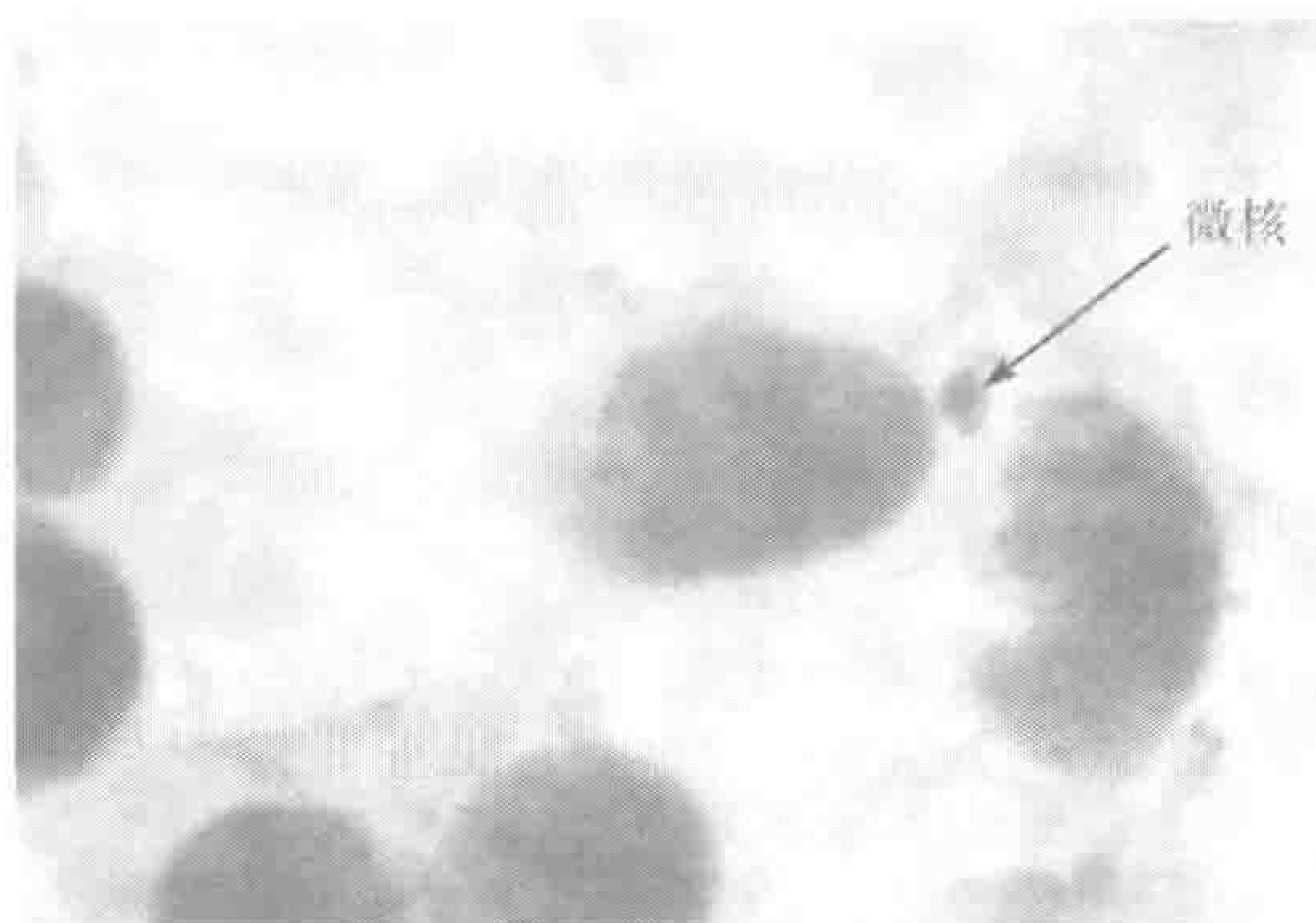


图 47-1　蚕豆根尖细胞中的微核

从一次细胞分裂开始到下一次细胞分裂开始的全过程，称为细胞分裂周期。现在公认的细胞周期由四个阶段组成：分裂期（M）和分裂间期的 G1 期、S 期、G2 期。分裂间期的细胞在显微镜下观察似乎处于静止状态，但在细胞内却进行着复杂而剧烈的生命活动，主要是蛋白质的合成、遗传物质的复制等，这些变化为下一步的细胞分裂做好准备。在显微镜下观察进入分裂期的细胞，可以看到细胞发生明显的变化，观察到各个时

期的细胞分裂相（分裂前期、中期、后期、末期和细胞质分裂期）。

【实验器材】

（1）显微镜、盖玻片、载玻片等显微解剖实验用具。载玻片和盖玻片一定要清洁干净，以免影响观察统计结果。

（2）人工光源：自制日光灯灯架，架高 50cm，光源为两支并列的 40W 日光灯。

（3）血球计数器。

（4）搪瓷盘、滤纸、光照培养箱、镊子、水浴锅、解剖针、滴管、小烧杯或指管等。

【材料和试剂】

1. 材料

蚕豆种子。

2. 试剂

（1）卡诺固定液：由 3 份纯酒精和 1 份冰醋酸混合而成（现用现配）。

（2）70%酒精。

（3）1.0mol/L 盐酸。

（4）1.0mol/L 氢氧化钠溶液。

（5）1%醋酸洋红：将 50mL 45%的醋酸水溶液放入 150mL 锥形瓶中文火煮沸，然后徐徐投入 0.5g 洋红粉末，再煮 1~2h，在此溶液中悬一个铁钉，1min 后取出，使染色剂中含有微量铁离子（或在溶液冷却后加入 1~2 滴醋酸铁溶液）以便增强染色效果。将溶液过滤后，置于具玻璃塞的棕色玻璃瓶中备用。

（6）20μmol/L $CdCl_2$溶液。

【实验内容与步骤】

1. 材料准备

取蚕豆种子，在蒸馏水中浸泡 24h，使种子充分吸胀，置于铺有滤纸的瓷盘中并盖上湿纱布，在 23℃的光照培养箱中培养 1~2 天，使其长出 1.5~3.0cm 长的初生根，此时切除初生根以保证侧根的生长发育。

2. 染毒处理

待侧根露白后，随机分组。每组选择 10 粒种子用配好的 20μmol/L $CdCL_2$溶液染毒处理 6h，取出后用蒸馏水冲洗，并移至蒸馏水中修复培养 24h。

3. 材料固定

取修复培养结束的蚕豆根尖 0.5~1cm 于卡诺固定液中固定 12~14h。

4. 材料解离

将固定后的根尖材料用 0.1mol/L 的盐酸在 60℃恒温水浴中解离 15~20min。

5. 制片

将解离后的根尖材料用蒸馏水漂洗数次，取出置于载玻片上，从根冠起切取根尖 1~1.5mm，用解剖针捣碎，滴上 1~2 滴染液，染色 10~15min。盖上盖玻片轻压。

6. 镜检

在 400 倍显微镜下，凡小于主核 1/4 以下的，与主核有相同染色效果的，圆形、椭圆形或其他类似形状的染色物质都可以算作微核。

7. 微核的定量表示

通常每一个处理组至少观察5张较好的片子，每张片子至少能观察到1000个以上的细胞。每1000个细胞出现的微核数称为微核千分率，每1000个细胞中出现微核的细胞数称为微核细胞千分率。

【思考与作业】

1. 微核千分率与微核细胞千分率有何区别？在什么情况下这两个指标数值相等？

2. 实验结果整理后请指出所观察到的经过处理后蚕豆根尖和对照组蚕豆根尖的微核千分率有何差别？试分析产生差别的原因。

3. 蚕豆根尖微核试验还能对其他环境要素的污染程度进行检测。试设计一个实验，应用蚕豆根尖微核试验技术对你所关注的环境污染进行监测。

实验48　种间竞争和他感作用

【实验目的】

种间竞争是指两个种在所需的环境资源不足的情况下发生的相互排斥关系。在这种相互关系中，竞争的双方在个体生长和种群数量增长方面都会受到抑制。种间竞争在自然界中是易于观察到的。种间竞争能力取决于种的生态位和生态幅，个体大小、生长速率、抗逆性以及植物的生长习性都影响竞争能力。种间竞争在决定共存的种类方面起着重要作用。

Candolle在1832年首先提出植物间存在他感作用。1937年Molisch给出他感作用（allelopathy）的定义：化学物质从一种植物转移到另一种植物的过程中，对另一种植物的直接或间接影响。他感作用发生在两个不同种之间，实际上是供体植物（他感植物）对受体植物（目标植物）的化学抑制作用。

通过本实验认识什么是种间竞争，种间竞争与他感作用的区别是什么。

【器材和材料】

1. 器材

花盆、有机肥、沙土、剪刀、漏斗、胶皮管、标签以及放置花盆的台阶型装置等。

2. 材料

种间竞争实验选用黑麦草（*Lolium perenne*）和高羊茅（*Festuca arundinacea*）种子；他感作用选用向日葵（*Helianthus annuus*）和莴苣（*Lactuca sativa*）种子。

【实验内容与步骤】

1. 种间竞争

实验设计：黑麦草和高羊茅种子按不同比例进行播种，从全部为黑麦草种子到全部为高羊茅种子，两者的比例分别为：0.00 : 1.00、0.25 : 0.75、0.50 : 0.50、0.75 : 0.25、1.00 : 0.00。每个实验有5个处理，每个处理3次重复，共需要15个花盆。

（1）将沙土和有机肥充分混匀，分别装到花盆里，使土面稍低于盆口约2cm，放在温室内备用。

（2）按上述比例，每盆均匀播种 40 粒种子。播完后，将每个花盆贴上标签，写明处理、重复编号和播种日期。将花盆摆在温室内，定期浇水、交换位置。

（3）种子萌发后，统计发芽率和幼苗存活情况。

（4）将生长 3 个月的幼苗进行收获，分盆分种统计并登记分蘖数、生物量和株高。

（5）将 3 个重复的分蘖数、生物量、株高进行统计。

（6）应用图解法进行分析。

2. 他感作用

实验设计：在台阶型装置上部的一排花盆（6 个）中，其中 3 个盆播种 10 粒向日葵种子作为处理组，另外 3 个作为空白对照组，下排花盆通过管子和漏斗与上面的盆相连（图 48-1）。

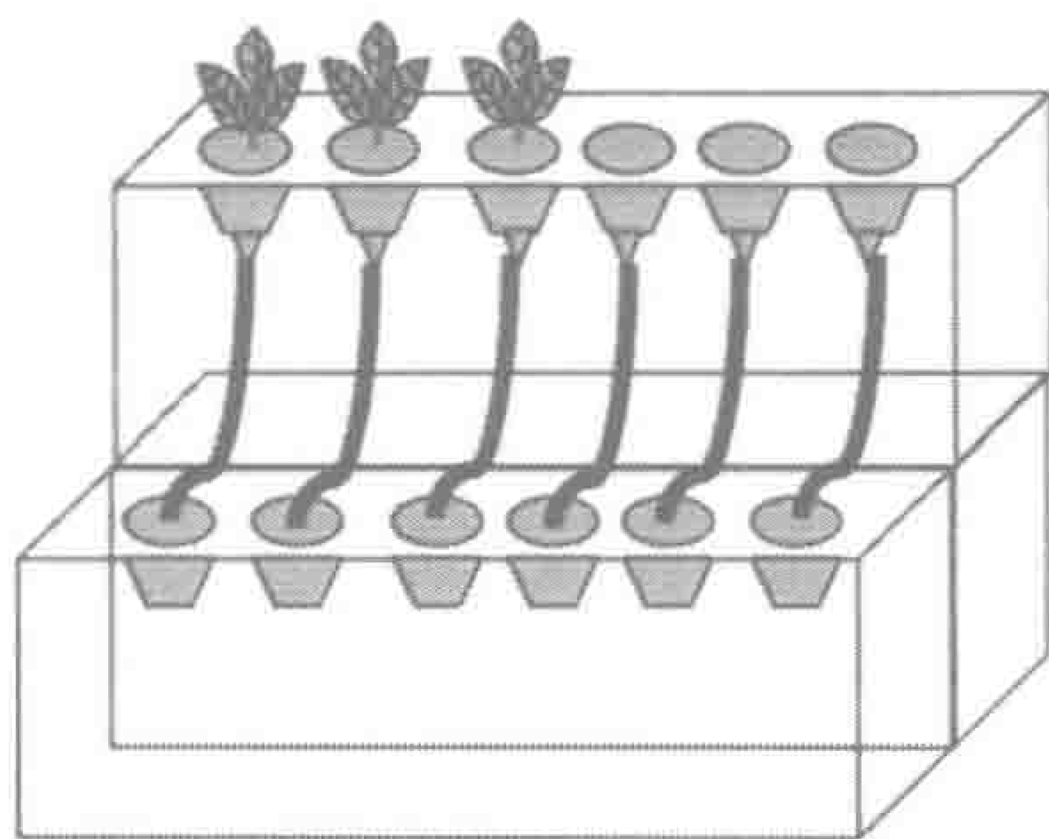


图 48-1　台阶型装置示意图

（1）将沙土和有机肥充分混匀，分别装到花盆里，使土面稍低于盆口约 2cm。

（2）在处理组的 3 个盆内播种向日葵种子，等向日葵的真叶出现后，开始定量浇自来水，使一部分水能从上部的盆中流出。第一次流出的水溶液弃去。第二次同样处理，将流出的水溶液通过胶皮管导入下排的盆中，同样过程进行两次以后，以保证下边花盆中的土壤含水量可以播种。对照组不播种，其余操作同处理组。

（3）在下排的花盆中，每盆播 50 粒莴苣种子，将每个花盆贴上标签，写明处理、重复编号和播种日期，同时登记在记录本上。

（4）定期定量给上面花盆浇水，以保证下面花盆中的莴苣能萌发、生长。

（5）莴苣种子萌发后，统计其发芽率和幼苗成活状况；3 周后以盆为单位收获，将地上部和地下部分开，装在纸袋中，65℃烘干称重。

（6）对所获得的数据进行分析。

【思考与作业】

1. 种间竞争的实质是什么？
2. 什么是他感作用？它与种间竞争的本质区别在哪里？

实验 49　植物群落调查和分析的基本方法

【实验目的】

掌握植物群落数量特征调查的方法，并对获得的数据进行整理，达到识别群落和认识群落性质的目的。

【实验器材】

测绳、皮卷尺、样方框、钢卷尺、求积仪、坐标纸、方格纸、记录表格等。

【实验方法】

1. 样方法

它是面积取样中最常用的形式，也是植被调查中最普遍使用的一种取样技术。样方的大小、形状和数目主要取决于所研究群落的性质。一般来说，群落越复杂，样方面积越大，取样的数目一般不少于5个。取样数目越多，取样误差越小。样方可分为以下几种：

（1）记名样方

主要用来计算一定面积中植物的多度、个体数或茎蘖数。比较一定面积内各种植物的多少，就是精确地测定多度。

（2）面积样方

主要是测定群落占生境面积的大小，或者各种植物占整个群落面积的大小，这主要用在比较稀疏的群落里。一般是按照比例把样方中植物分类标记到坐标纸上，然后再用求积仪计算。有时根据需要，分别测定整个样方中全部植物所占的面积（面积样方），以及植物基部所占的面积（基面样方）。这些在认识群落的盖度、显著度中是不可缺少的。

（3）生物量样方

主要是测定一定面积样方内群落的生物量。将样方中地上或地下部分进行收获称重，分析其中各类植物的地下或地上生物量。该方法适用于草本植物群落，对于森林群落，多采用体积测定法。

（4）永久样方

为了进行追踪研究，可以在样方外围用明显的标记进行固定，从而便于以后再在该样方中进行调查。一般多采用较大的铁片或铁柱在样方的左上方和右下方打进土中深层位置，以防位置移动。

2. 样带法

为了研究环境变化较大的地段，以长方形作为样地面积，而且每个样地面积固定，宽度固定，几个样地按照一定的走向连接起来，就形成了样带。

样带的宽度在不同群落中是不同的，草原地区为10~20cm，灌木林为1~5m，森林为10~30m。

有时，在调查一个环境异质性比较突出、结构也比较复杂多变的群落时，为了提高工作效率，可以沿一个方向、中间间隔一定的距离布设若干平行的样带，再在与此相垂直的方向，同样布设若干平行样带。在样带纵横交叉的地方设立样方，并进行深入地调查分析。

3. 样线法

用一条绳索置于所要调查的群落中，调查绳索一边或两边的植物种类和个体数。样线法获得的数据在计算群落数量特征时，有其特有的计算方法。它往往根据被样线所截的植物个体数目、面积等进行估算。

【实验内容与步骤】

每组4~6人，在选定的样地上进行调查并填表。注意根据不同的调查目的确定测量项目。如已确定植被性质为目标，就不一定进行耗时过多的重量测定；测定了密度，就不一定记载多度。如进行群落的定量分析，必须取得确切的数据。德氏多度与盖度级估

测指标不便于定量计算，但对群落性质的一般了解，这两个指标具有快速、方便的优点。此外，为了评价草场资源而进行地上生物量测定，最好进行专门研究。例如，可普遍进行群落地上总产量测定，再根据各个种的其他相对数值推算各个种或不同类群的重量比例。

样方法对重量、密度两项数量指标是方便可靠的，实测数据比较客观；而对频度的测定，则受样方大小影响甚大；对盖度的测定，则不如其他方法客观（如样线法）。每组填写完毕后，按重量、重要值及优势比分别计算、整理，按作用的大小排列各个种，并进行比较、分析。

表 49-1　草原植被野外调查表

图幅号____________________

经纬度____________________

调查地点____________________

植被类型____________________

样地编号____________________
调查地点____________________
调查日期______年_____月______日
调查人____________________
____
____

群落名称____

地形（附简图及样地部位）

海拔____________________

坡向____________________　坡度____________________

地表状况（微起伏、岩石出露否、有无水蚀、龟裂等）____________________
____

地面覆盖/%________　裸露________　砾石________　凋落物________　草群________

土壤类别及名称____________________　土壤记载编号____________________

土壤一般特点（基岩、土壤厚度、质地、A 层厚度、颜色、pH 反应）____________________
____
____

群落分布范围、边界、组合____________________
____
____

利用现状及人类影响程度（未利用、利用适中、利用过度等）____________________
____
____

群落外貌、季相、成层现象及镶嵌现象____________________
____
____

水分补给状况____________________

畜牧业供水状况____________________

野生动物活动____________________

对本群落类型的野外评价____________________
____
____

表 49-2　种类组成描述

样地号：__________　记载面积：__________　调查日期：__________　记载人：__________

总盖度：____________________

植物名称	营养苗高度/cm		生殖苗高度/cm		株（丛）幅		盖度	多度	密度	物候	重量/g				频度/%										
	最高	平均	最高	平均	平均	最大					鲜重	%	干重	%	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均

表 49-3　样方抽样技术植被分析简表

日期：____________ 地点：____________ 群落（编号或类型）：____________

观测人姓名：____________ 样方大小：____________

数量指标 / 种名	密度	相对密度	优势度	相对优势度	频度	相对频度	重要值

【思考与作业】

1. 对森林群落而言，取哪些数量指标较为合适？为什么？
2. 试分析重要值与优势度的异同。

实验 50　植物群落的物种多样性分析

【实验目的】

生物多样性分为三个层次：遗传多样性、物种多样性和生态系统多样性。本实验仅从群落特征角度进行物种多样性的测量和分析。

物种多样性分析有以下三方面的生态学意义：①它是描述群落结构特征的一个指标；②用来比较两个群落的复杂性，作为环境质量评价和比较资源丰富程度的指标；③从演替阶段的多样性比较，可作为演替方向、速度及稳定程度的指标。

通过对群落中物种的多样性的测定，认识多样性指数的生态学意义及掌握测定物种多样性的方法。

【实验原理】

多样性指数是以数学公式描述群落结构特征的一种方法。在调查植物群落的种类及其数量之后，选定多样性公式，就可计算反映该群落结构特征的多样性指数。

计算多样性的公式有很多，形式各异。大部分多样性指数中，组成群落的生物种类越多，其多样性的数值越大。

本实验采用 Simpson 多样性指数和 Shannon-Wiener 多样性指数来进行植物群落物种多样性的分析。

Simpson 多样性指数回答了这样的问题：在无限大的群落中，随机取样得到同种的两个样本，它们的概率有多大？如在北方寒带森林中，随机抽取两株树木样本，得到同一种的概率很高；相反，在热带雨林中，这个概率就很低。Simpson 多样性指数公式如下：

$$D = 1 - \sum\{n_i \cdot (n_i - 1)/[N \cdot (N-1)]\} \tag{50-1}$$

式中，D：Simpson指数；N：总个体数量；n_i：第 i 个种的个体数量。

Shannon-Wiener 多样性指数是目前应用较多的物种多样性指数，它计算方便，统计处理手段比较成熟，可以用来估测不同群落之间多样性水平的差异。

$$H = -\sum(p_i \cdot \ln p_i) \tag{50-2}$$

式中，H：Shannon-Wiener指数；p_i：第 i 个种在全体物种中的重要性比例，如果针对个体数量而言，则有 $p_i = n_i / N$，n_i 为第 i 个种的个体数量，N 为总个体数。

【实验器材】

$1m^2$样方框、铅笔、野外调查记录表格、计算器。

【实验内容与步骤】

每两个学生为一组，在已经选定的若干群落类型中分别用 $1m^2$样方测定其物种数和每个种的个体数。在每种类型的群落里重复随机取样 10 次。

【思考与作业】

1. 按群落类型整理合并数据，并分别按照上述公式计算 Simpson 和 Shannon-Wiener 多样性指数。

2. 比较不同群落类型的物种多样性指数，并探讨其中的生态学意义。

主要参考文献

鲍士旦. 2000. 土壤农化分析. 北京: 中国农业出版社

李合生. 2000. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社

李家实. 2002. 中药鉴定学. 上海: 上海科学技术出版社

刘祖琪, 张石城. 1994. 植物抗性生理学. 北京: 中国农业出版社

吕殿录. 2000. 环境保护简明教程. 北京: 中国环境科学出版社

内蒙古大学生物系. 1986. 植物生态学实验. 北京: 高等教育出版社

秦怀英, 李友钦. 1991. 碳酸氢钠法测定土壤有效磷几个问题的探讨. 土壤通报, 22(6): 285~288

苏家桎. 1988. 土壤农化分析手册. 北京: 中国农业出版社

孙儒泳, 李博, 诸葛阳等. 1993. 普通生态学. 北京: 高等教育出版社

王伯荪, 余世孝. 1996. 植物群落学实验手册. 广州: 广东高等教育出版社

杨持. 2003. 生态学实验与实习. 北京: 高等教育出版社

张志良, 瞿伟菁, 张雯. 2003. 植物生理学实验指导. 第三版. 北京: 高等教育出版社

中国科学院上海植物生理研究所和上海市植物生理学会. 1999. 现代植物生理学实验指南. 北京: 科学出版社

周纪伦, 郑师章, 杨持. 1992. 植物种群生态学. 北京: 高等教育出版社

周仪. 1987. 植物形态解剖试验. 北京: 北京师范大学出版社

朱广廉, 钟诲文, 张爱琴. 1990. 植物生理学实验. 北京: 北京大学出版社

邹奇. 2000. 植物生理学实验指导. 北京: 中国农业出版社

J. R. 埃塞林顿著. 曲仲湘, 陈昌笃等译. 1989. 环境和植物生态学. 北京: 科学出版社

S. B. 查普曼著. 阳含熙译. 1980. 植物生态学的方法. 北京: 科学出版社

Scopes R K. 1969. Crystalline 3-phosphoglycerate kinase from skeletal muscle. Biochem J., 113(3): 551~554

Servaites J C, Schrader L E, Edwards G E. 1978. Glycolate synthesis in a C3 C4 and intermediate photosynthetic plant type. Plant and Cell Physiology, 19(8): 1399~1405

附录I 生 物 绘 图

1. 生物绘图的方法

（1）绘图前一定要准备好必需的用具，本课程要求自备如下用具：硬铅笔 3H 或 4H 一枝，削铅笔刀、橡皮、尺子、绘图纸（16 开报纸或道林纸），实验记录本一册。

（2）绘图前必须对所观察物体各部分的特点认识清楚，然后再着手绘图。

（3）所绘的图在图纸上的位置应布局合理，图形清晰，绘图纸整洁。

（4）绘图必须有严格的科学性，能正确反映所观察物体的特点，做到形体、大小、比例、准确、线条清楚，重点突出，不能抄袭书本上的图或凭空想像。

（5）每个实验名称写在图纸的上方，图中所用材料及观察部位的说明写在图的下方，构造的注解要用平行线引出，然后正确地标出其名称。

（6）图中每一个说明均用铅笔正楷字书写。

2. 如何绘细胞图

前面介绍了绘图的注意事项，现简单介绍绘细胞图的方法和步骤：

（1）描绘在显微镜下所见到的材料时，显微镜放在左边，绘图纸放在右边。用左眼看显微镜，同时张开右眼，这样可以边观察边绘图。

（2）在低倍显微镜下选定一个较完整、清楚的细胞，注意其形状和特点，然后用高倍显微镜观察其细致的结构。

（3）在图纸上选定适当的位置，用极轻的短线绘出细胞的轮廓和关键的地方（如角突出处）。注意：细胞长宽的比例要正确。全图不可太大或太小，约占图纸的 1/4，放在中央偏左较为合适。

（4）用粗细适当，均匀的线条绘出细胞壁。注意：线条不可重复描绘，连接地方应光滑。

（5）注意相邻细胞的位置及它们之间的关系。要绘出相邻细胞的部分细胞壁。

（6）用极轻的点绘出细胞核与细胞质的界限。然后打点显出各部分的详细构造。深暗处用密点，明淡处用疏点以至无点，点应小而圆，切勿用铅笔涂沫。

（7）图的注解要用虚线引向右方，用铅笔正楷字书写。

（8）最后写出实验的名称（在图纸的上方）和所用材料的名称（在图纸的下方）。

3. 如何绘组织图

组织是由一群细胞组成，绘图时必须绘数个细胞，才能表示细胞彼此结合的关系（例如细胞排列得紧密或疏松，相邻细胞的壁如何相连等）；并且不同组织的功能各不相同，其细胞的形态构造也各有特点。因此绘图时必须注意表达细胞群的特点。

4. 如何绘器官图

器官的构造是由不同种类的组织组成，因此不但要了解组织的特点，还要注意不同组织在器宫内的分布和它们之间的联系。

描绘器官的构造图比绘制组织图更为复杂，常用以下几种方法。

（1）器官内部构造的轮廓图（图解图），这种图只表示器官切面的轮廓，不绘细胞内部构造。

① 用线条绘出器官解剖构造的轮廓。

② 在轮廓图上用不同粗细的线条区分出各类组织的界限。

③ 注意各类组织分布的比例。

（2）器官内部构造的详图：图不仅能表示器官构造的轮廓，还能表示各类组织、细胞构造的特征，具体步骤如下：

① 绘器官内部构造详图时，一般只绘标本的一部分（1/8~1/2），但要表示清楚器官构造的特点。

② 用轻线条拟定器官构造图形的轮廓。

③ 在轮廓内再用线条区分出各类组织的分布，注意各类组织的比例要适当。

④ 根据组织的细胞特点，逐一描绘细胞的结构及细胞间的相互联系，如细胞的形状、大小，细胞壁的厚薄，细胞排列等。靠近图边缘的细胞，可以只绘每个细胞的一部分，表达图是标本的一部分。

⑤ 加点或线条时，详细表示各部分特征。如细胞壁增厚处可视增厚情况用双线条表示。

⑥ 图绘完毕，逐个标明各部分名称。

（3）器官内部构造的轮廓图与详图：即在同一图上用轮廓图和详图相结合的方法来表示器官的构造。轮廓图表达器官切面全貌的构造，再选一部分绘出细胞的详细构造。具体方法可以按照上述 2、3 两种绘图法进行。

附录Ⅱ　基本实验技术

1. 临时装片标本的制作

临时装片是将新鲜材料放在载玻片的水滴中，再盖上盖玻片制成玻片标本的方法。该方法制成的玻片标本既可以观察到材料的生活状态及天然色彩，又可将其制成永久制片，其基本方法如下：

（1）擦净载玻片与盖玻片；

（2）在载玻中央滴一滴蒸馏水；

（3）将待观察的材料放在水滴当中；

（4）加盖盖玻片；

（5）用滤纸吸取盖玻片周围多余的水分；

（6）显微观察。

2. 徒手切片的制作

徒手切片主要是借助显微镜，快速了解植物细胞、组织、器官的外部形态和内部结构。因此必须把植物组织切成薄片，制成临时玻片标本或永久玻片标本（永久制片），然后进行观察。

（1）准备：首先检查本实验所需的仪器、用具、药品、材料等是否齐备。然后洗擦载玻片、洗时先将载玻片与盖玻片用肥皂水洗干净、清水洗净，由水中取出，（或浸泡于70%酒精中待用），用纱布擦干。擦干时用左手母指与食指持玻片的边缘（注意不要用手指涂玻片表面），右手持纱布，将玻片夹于两层纱布之间，然后移动拭擦，注意用力要均匀，将拭擦好的玻片放在一定的地方备用。

（2）切片：最简单和常用的切片方法是徒手切片法。即手执刀片（或剃刀）将新鲜的材料，如植物的根、茎、叶等切成薄片，切片一般有：

有长轴的物体：①横切面，切面与材料的轴相垂直；②纵切面，切面与材料的轴相平行。

叶片状扁平物体：①横切面，切面与叶状体的面垂直；②纵切面，切面与叶状体的面平行。

切片开始时，取长约2~3cm的材料一段，用左手大母指和食指夹住材料，并使材料的轴面与水平面相垂直。材料的上端伸出2~3mm，不宜太高，否则材料容易摇动，材料的下端可用中指顶住，切片时将材料缓缓向上顶。右手以拇指和食指把持刀片，刀口向内。

切片时右手持平刀片并蘸水使之清润，然后刀口应以水平方向斜滑，不可向内平切，更不可向外切。左手保持稳定，千万不可两手同时拉动，（初学者，一时不习惯，可将左手的臂贴在桌上，右手持刀进行切片），每切2~3片后，就把所切材料的薄片轻轻移入盛有清水（或50%~70%酒精）的培养皿中，以备取用，注意不要切斜（因为斜向切面的结构是不清楚的），材料要切得平、薄、全。如材料微小、扁、薄、软，可用马铃薯块茎、

胡萝卜根等作为支持物，夹住后再切。使用时，可先用刀片把支持物切成小长方块，在其中央挖一沟或切一条缝，将材料嵌入其中即可切片。

切片后就可以进行观察，但有时候为了使植物组织细胞的不同部位显得更为清晰，可对材料进行染色。

（3）染色：染色的方法很多，视材料和实验内容不同而异，这里只介绍用番红染色的一个例子：用镊子夹取材料的边缘，选切好的薄片，放入盛有 0.1%番红水溶液的小培养皿中，染色 1~2min。再放入清水中冲洗，直到不再退出红色为止。然后可进行封片观察。

（4）封片（水或甘油封片）：把没有染色或染色的薄片平放在载玻片中央，加1滴清水，盖上盖玻片，要使水充满于盖片之下，且避免产生气泡。如有气泡或水太少时，可用滴管从盖玻片的一侧边缘加水，绝对要保持盖玻片表面不沾水，若沾水时可用吸水纸或纱布将水擦去。盖玻片内水也不宜过多，以免盖玻片浮动。以上封片的方法叫作水封片（如果载玻片上放的是 1 滴甘油，则为甘油封片），封片完毕即可放在低倍镜下观察。

3. 永久制片的制作——石蜡切片的制作

（1）取材：选取要进行制片的新鲜材料，如根茎过渡区部分的材料，将其切成 5mm 长的小段。

（2）固定：将材料放入盛有 FAA 固定液的带盖的器皿中，固定 24h。若不急于制片，可将固定好的材料转入 70%酒精中长期保存。

（3）脱水：将固定好的材料依次浸泡于 70%、85%、95%与纯酒精的浓度梯度中，把材料里的水分脱净，每级处理需要 1~3h。

（4）透明：脱水后的材料经 1/2 酒精+1/2 二甲苯的混合液处理 2~3h 后，再经纯二甲苯处理两次，每次 1~2h。目的是除去材料中的酒精，让材料充分透明。

（5）浸蜡：将盛有透明好的材料与二甲苯溶液中缓慢加入与二甲苯等量的熔化好的石蜡（52~54℃），然后敞盖置于 37℃熔蜡箱中数小时至数日，时间长短视材料大小而定。然后，将温箱的温度升高至 56℃左右（高出原石蜡的 1~2℃），待石蜡完全熔化为止。倒掉二甲苯与石蜡的混合液，将材料转至盛有 56~58℃已熔化的石蜡中，每隔 2~4h 换一次新石蜡，连续置换 3 次。目的是将材料中的二甲苯完全去除，让石蜡完全渗入到材料当中。

（6）包埋：将材料和石蜡一起倒入预先准备好的小纸盒中，并在石蜡凝固之前尽快将材料按照一定的间距调整好位置，然后，将小纸盒迅速放入冷水盆中使之尽快冷却。

（7）修块：将包埋好的蜡块，按照需要的切面修理成适当的大小。为了保证切片时能切成平直的蜡带，注意蜡块的上下两个边要保持平行。

（8）粘接：将修整好的蜡块粘接在小木块上。具体做法是用烧热的蜡铲将蜡块的底部粘接在小木块上。

（9）切片：将固定在小木块上的蜡块进行修正，然后，固定在旋转切片机上，调整好一定的厚度，进行切片。切片的厚度视材料而定，一般厚度在 8~15μm 左右。

（10）粘片：在洁净的载玻片上涂少许明胶粘贴剂，使其干燥。用时，在涂有粘贴剂的载玻片上滴 1 滴蒸馏水，再将镜检合格的一定长度的蜡带摆在蒸馏水上，将载玻片置于 35~45℃的展片台上，使蜡带展平。然后，在室温或温箱中干燥。

（11）染色：为了使细胞和组织显示出各自的特点，采用不同的染料进行染色。由于染色方法很多，在此不一一介绍，所以只介绍一种最常用的番红-固绿对染法，具体流程如下（在染色缸中进行）：

① 脱蜡：将贴有蜡带的载玻片放入纯二甲苯中，使石蜡完全溶解。每次约 20~30min，连续处理两次。

② 去掉二甲苯：依次经二甲苯:纯酒精（2:1）、二甲苯:纯酒精（1:1）、二甲苯:纯酒精（1:2）溶液，再经纯酒精两次，逐步去掉二甲苯。每级约 10min。

③ 复水：经 95%、85%、70%、50%酒精溶液。

④ 番红染色：经 1%番红酒精溶液染色 2~24h。

⑤ 脱水：经番红染色后需经水洗，洗掉浮色。然后经 50%、70%、85%、95%的酒精溶液脱水。

⑥ 固绿对染：在 0.1%固绿的 95%酒精中对染 10~30s。

⑦ 继续脱水：经 95%酒精，两次纯酒精彻底脱水，每次 30~60s。

⑧ 透明：经 1/2 二甲苯+1/2 纯酒精，10min，再经两次纯二甲苯，每次 10~20min，使材料充分透明。

（12）封片：取出标本，立即在材料上滴加 1 滴树胶，盖上盖玻片，置于室温或 30~35℃温箱中烘干。

4. 解离组织标本制备法

为了观察一个细胞的立体形态结构，可以用一些化学药品将细胞壁中的中层物质（中胶层）溶解，使细胞分离散开，这样便于观察。

在进行解离前，先把材料洗净，切成不粗于火柴杆的细长条或小片状。

（1）铬酸-硝酸离析法

将材料放入小玻璃皿中，加入离析液，加入量约为材料的 2~3 倍，放置 30~60min，直到用玻璃棒挤压材料能离散时为止，倒掉酸液，材料用清水洗净，然后放在 50%的酒精中保存，随时观察。

铬酸-硝酸离析法的配方：20%铬酸离析液 1 份，20%硝酸离析液 1 份，两种溶液混合使用。

（2）硝酸离析法

将材料置于试管中，加入 20%硝酸（加入量以能淹没材料为宜），在小火焰上微微加热或在沸水浴中加热，不时用玻璃棒搅拌至用玻璃棒挤压材料能离散时为止，倒去酸液，用清水洗净材料，保存在蒸馏水中，随时取用。

5. 液浸标本的制作方法

液浸标本的制作是保存多浆汁标本或保存自然色泽标本的重要生物学方法之一，浸制的标本可长期保存使用。

（1）福尔马林（甲醛）液浸法：即用 5%的溶液浸泡标本，其优点是配制方便，价格便宜，缺点是标本的自然颜色容易褪变，浸泡过久标本变得太柔软影响观察。

标本制备步骤：

① 准备大小适宜的干净标本瓶。

② 配制浸液：95mL 蒸馏水中加入 5mL 福尔马林溶液（浸液约标本瓶容量的一半）。

③ 取出标本洗净，轻轻放入标本瓶内，随即倾入浸液，盖好瓶盖。

④ 将准备在铝杯中的石蜡置于酒精灯上熔化，用毛笔蘸熔蜡涂于瓶盖四周，使瓶口封闭。

⑤ 贴加标签于标本瓶底部。

标签格式：

标本名称	
浸液名称	
制作日期	
制作人	

（2）70%乙醇液浸法：此方法使标本长期保持性质不变。配制也方便，但标本自然色泽不能保存，且价格较贵。

标本制备步骤：

① 准备好标本瓶。

② 配制浸液：取95%乙醇70mL，加入蒸馏水25mL。之后，按照上述③④⑤操作。

③ 标本浸入上述两种浸液以前，还可用下列方法处理，使之保持自然的色泽。

A 红色或黄色标本保存液的配制：

i 准备好标本瓶。

ii 配制浸液：将50g氯化锌溶于1L水中，加热使之溶解，冷却后过滤，在过滤液中加入25mL福尔马林，方法同福尔马林液浸法。

B 绿色标本保存液的配制：

i 准备好标本瓶。

ii 配制浸液：在10%冰醋酸中加入醋酸铜粉末，用玻璃棒搅动使之饱和为止。

将标本洗净放入标本瓶中，并加入醋酸铜冰醋酸液，3~7天后，标本将由绿色褪变成黄褐色，然后又变成绿色（注意植物老嫩不同所需时间长短也不同），或将醋酸铜冰醋酸液加热至35℃，把标本放入其中，绿色标本将先褪变为褐色而后变为绿色。

取出标本用水洗去标本上的浮色，放入水中浸洗一昼夜，然后将标本置于5%的福尔马林溶液中保存，最后封闭瓶口，方法同上。

6. 显微测微尺的应用

显微测微尺是在显微镜下用来测定物体的工具，如用于测量细胞的大小、细胞壁的厚薄、淀粉粒大小等。测微尺有两种：

（1）接目测微尺：为一圆玻璃片，内封藏有一刻度尺，常分为10大格，共100格，此圆玻璃片安装在接目镜内。

（2）接物测微尺：为一特制载玻片，片上刻有精细的尺度，通常1mm，共100小格，故每格相当于0.01mm，即10μm。测量方法如下：

先计算每一小格的数值：将接物测微尺放在载物台上，分别于低倍和高倍镜下将接物测微尺的刻片调节在视野的中央。

再将接目测微尺小心放入接目镜内，适当移动接目镜或接物测微尺，使目镜测微尺和物镜测微尺的刻度相重合，根据两尺刻度重合小格的比值，计算出接目测微尺每一小

格的数值（单位为μm），然后将接物测微尺取下，换以装有待测物体的玻片制片、以接目测微尺测量欲测物，其小格数乘以上述每一小格的微米数即得，例如，物镜测微尺 10 刻度与目镜测微尺 5 刻度相重合，物镜测微尺每一刻度为 10μm，则刻度为 100μm，用 5 除 100，就是目镜测微尺每一刻度的“值”即等于 20μm。如果用固定的显微镜工作，最好标出所有目镜和物镜组合时目镜测微尺刻度的值，列成表格贴在显微镜盒的小门上。

附录 III　常用试剂的制备

1. 常用染色试剂

（1）FAA 固定液

70%酒精 90mL，福尔马林 5mL，冰醋酸 5mL。幼嫩材料可用 50%酒精代替 70%酒精，以防材料收缩。

（2）钌红溶液

钌红是细胞胞间层的专性染料。5~10mg 钌红溶于 25~50mL 蒸馏水中即可。此染液不易保存，应现用现配。

（3）番红染液

是一种碱性染料，可使木质化、角质化、栓质化的细胞壁及细胞核中的染色质和染色体染成红色。常与固绿配合使用。

番红水溶液：0.1g 番红，溶于 100mL 蒸馏水中，过滤后备用。

番红酒精溶液：0.5~1g 番红，溶于 100mL 50%酒精中，过滤后方可使用。

（4）固绿染液

是一种酸性染料，可使纤维素的细胞壁和细胞质染成绿色。常与番红配合使用。0.1g 固绿溶于 100mL 95%酒精溶液，过滤后即可使用。

（5）苏丹Ⅲ溶液

苏丹Ⅲ作用于脂肪、角质或栓质时发生橘红色反应。

① 0.1g 苏丹Ⅲ，溶于 10mL 95%酒精中，过滤后，再加入 10mL 甘油。

② 0.1g 苏丹Ⅲ，溶于 50mL 丙酮中，再加入 70%酒精 50mL，即可使用。

（6）碘-碘化钾溶液

可将蛋白质染成黄色。若用于淀粉鉴定，需稀释 3~5 倍；若用于观察淀粉的轮纹，需稀释 100 倍以上。

3g 碘化钾，溶于 100mL 蒸馏水中，再加入 1g 碘，溶解后即可使用。

（7）间苯三酚溶液

间苯三酚与本质素相遇时发生桃红色反应。5g 间苯三酚溶于 95%酒精 100mL 中即可。染色时要先在材料上加1滴盐酸（因间苯三酚在酸性环境中才能与本质素起作用），过 5min 后再滴加间苯三酚。此液储存不超过三个月，溶液呈黄褐色时失效。

（8）碘氯化锌溶液

碘-氯化锌作用于纤维素时发生蓝色反应。其配制方法是：取 20g 氯化锌+6.5g 碘化钾+1.3g 碘+10.5mL 水。试剂配好后避光保存。

（9）明胶粘贴剂

在 30~40℃蒸馏水中慢慢加入 1g 明胶，待全部溶解后，再加入 2g 苯酚和 15mL 甘油，搅拌至完全溶解为止，然后，用纱布过滤，贮藏于瓶中备用。

（10）醋酸洋红染剂配制法

取 100mL 醋酸水溶液，放入锥形瓶中煮沸。停止加热后，加入 1g 洋红粉末。待全

部放入后再继续煮 1~2min。 然后用棉线缚一铁钉， 悬入染料中（或三氧化铁溶液）1min。染料过滤后，放入棕色试剂瓶中备用。

2. 常用缓冲溶液

（1）甘氨酸-HCl 缓冲液（0.05mol/L）

pH	X/mL	Y/mL	pH	X/mL	Y/mL
2.2	50	44.0	3.0	50	11.4
2.4	50	32.4	3.2	50	8.2
2.6	50	24.2	3.4	50	6.4
2.8	50	16.8	3.6	50	5.0

甘氨酸的相对分子质量=75.07，0.2mol/L 甘氨酸溶液含 15.01 g/L。

XmL 0.2mol/L 甘氨酸+Y mL 0.2mol/L HCl 加水稀释至 200mL。

（2）Na_2HPO_4-柠檬酸缓冲液

pH	0.2mol/L Na_2HPO_4/mL	0.1mol/L 柠檬酸/mL	pH	0.2mol/L Na_2HPO_4/mL	0.1mol/L 柠檬酸/mL
2.2	0.40	19.60	5.2	10.72	9.28
2.4	1.24	18.76	5.4	11.15	8.85
2.6	2.18	17.82	5.6	11.60	8.40
2.8	3.17	16.83	5.8	12.09	7.91
3.0	4.11	15.89	6.0	12.63	7.37
3.2	4.94	15.06	6.2	13.22	6.78
3.4	5.70	14.30	6.4	3.85	6.15
3.6	6.44	13.56	6.6	14.55	5.45
3.8	7.10	12.90	6.8	15.45	4.55
4.0	7.71	12.29	7.0	16.47	3.53
4.2	8.28	11.72	7.2	17.39	2.61
4.4	8.82	11.18	7.4	18.17	1.83
4.6	9.35	10.65	7.6	18.73	1.27
4.8	9.86	10.14	7.8	19.15	0.85
5.0	10.30	9.75	8.0	19.45	0.55

$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$的相对分子质量=178.05；0.2mol/L Na_2HPO_4溶液含 35.61g/L。

柠檬酸 · H_2O的相对分子质量=210.14；0.1mol/L柠檬酸溶液含 21.01g/L。

（3）柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液（0.1mol/L）

pH	0.1mol/L 柠檬酸/mL	0.1mol/L 柠檬酸钠/mL	pH	0.1mol/L 柠檬酸/mL	0.1mol/L 柠檬酸钠/mL
3.0	18.6	1.4	5.0	8.2	11.8
3.2	17.2	2.8	5.2	7.3	12.7
3.4	16.0	4.0	5.4	6.4	13.6
3.6	14.9	5.1	5.6	5.5	14.5
3.8	14.0	6.0	5.8	4.7	15.3
4.0	13.1	6.9	6.0	3.8	16.2
4.2	12.3	7.7	6.2	2.8	17.2
4.4	11.4	8.6	6.4	2.0	18.0
4.6	10.3	9.7	6.6	1.4	18.6
4.8	9.2	10.8			

柠檬酸：$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$，相对分子质量=210.14，0.1mol/L柠檬酸溶液含 21.02g/L。

柠檬酸钠：$Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$，相对分子质量=294.12，0.1mol/L柠檬酸钠溶液含 29.41g/L。

（4）醋酸（HAc）-醋酸钠（NaAc）缓冲液（0.2mol/L）

pH	0.2mol/L NaAc/mL	0.2mol/L HAc/mL	pH	0.2mol/L NaAc/mL	0.2mol/L HAc/mL
3.6	0.75	9.25	4.8	5.90	4.10
3.8	1.20	8.80	5.0	7.00	3.00
4.0	1.80	8.20	5.2	7.90	2.10
4.2	2.65	7.35	5.4	8.60	1.40
4.4	3.70	6.30	5.6	9.10	0.90
4.6	4.90	5.10	5.8	9.40	0.60

NaAc·$3H_2O$，相对分子质量=136.09，0.2mol/L NaAc溶液含 27.22g/L。

（5）磷酸缓冲液（0.067mol/L）

pH	0.067mol/L Na_2HPO_4/mL	0.067mol/L KH_2PO_4/mL	pH	0.067mol/L Na_2HPO_4/mL	0.067mol/L KH_2PO_4/mL
4.92	0.10	9.90	7.17	7.00	3.00
5.29	0.50	9.50	7.38	8.00	2.00
5.91	1.00	9.00	7.73	9.00	1.00
6.24	2.00	8.00	8.04	9.50	0.50
6.47	3.00	7.00	8.34	9.75	0.25
6.64	4.00	6.00	8.67	9.90	0.10
6.81	5.00	5.00	9.18	10.00	0.00
6.89	6.00	4.00			

$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$，相对分子质量=178.05，0.067mol/L Na_2HPO_4溶液含 11.876g/L。

KH_2PO_4，相对分子质量=136.09，0.067mol/L KH_2PO_4溶液含 9.078g/L。

（6）硼砂-NaOH 缓冲液（0.05mol/L 硼酸根）

pH	X/mL	Y/mL	pH	X/mL	Y/mL
9.3	50	0.0	9.8	50	24.0
9.4	50	11.0	10.0	50	43.0
9.6	50	23.0	10.1	50	46.0

硼砂：$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$，相对分子质量=381.43，0.05mol/L硼酸根溶液内含 19.07g/L。

XmL 0.05mol/L 硼砂+YmL 0.2mol/L NaOH 加水稀释至 200mL。

（7）甘氨酸-NaOH 缓冲液（0.05mol/L）

pH	X/mL	Y/mL	pH	X/mL	Y/mL
8.6	50	4.0	9.6	50	22.4
8.8	50	6.0	9.8	50	27.2
9.0	50	8.8	10.0	50	32.0
9.2	50	12.0	10.4	50	38.6
9.4	50	16.8	10.6	50	45.5

甘氨酸的相对分子质量=75.07，0.2mol/L 甘氨酸溶液含 15.01g/L。

XmL 0.2mol/L 甘氨酸+YmL 0.2mol/L NaOH 加水稀释至 200 mL。

（8）Tris-HCl 缓冲液（0.05mol/L）

pH		0.2mol/L Tris/mL	0.1mol/L HCl/mL	pH		0.2mol/L Tris/mL	0.1mol/L HCl/mL
23℃	37℃			23℃	37℃		
9.10	8.95	25	5	8.05	7.90	25	27.5
8.92	8.78	25	7.5	7.96	7.82	25	30.0
8.74	8.60	25	10.0	7.87	7.73	25	32.5
8.62	8.48	25	12.5	7.77	7.63	25	35.0
8.50	8.37	25	15.0	7.66	7.52	25	37.5
8.40	8.27	25	17.5	7.54	7.40	25	40.0
8.32	8.18	25	20.0	7.36	7.22	25	42.5
8.23	8.10	25	22.5	7.20	7.05	25	45.0
8.14	8.00	25	25.0				

Tris（三羟甲基氨基甲烷）的相对分子质量=121.14，0.2mol/L Tris 溶液含 24.23g/L。

XmL 0.2 mol/L 三羟甲基氨基甲烷+YmL 0.1 mol/L HCl 加水稀释 100mL。

（9）硼酸-硼砂缓冲液

pH	0.05mol/L 硼砂/mL	0.2mol/L 硼酸/mL	pH	0.05mol/L 硼砂/mL	0.2mol/L 硼酸/mL
7.4	1.0	9.0	8.2	3.5	6.5
7.6	1.5	8.5	8.4	4.5	5.5
7.8	2.0	8.0	8.7	6.0	4.0
8.0	3.0	7.0	9.0	8.0	2.0

硼砂：$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$，相对分子质量=381.43，0.05mol/L硼砂溶液内含 19.07g/L。

硼酸：H_3BO_3，相对分子质量=61.84，0.2mol/L硼酸溶液含 12.37g/L。

硼砂易失去结晶水，必须放入带塞的瓶中保存。

（10）碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液（0.1mol/L）

pH		0.1mol/L Na_2CO_3/mL	0.1mol/L $NaHCO_3$/mL	pH		0.1mol/L Na_2CO_3/mL	0.1mol/L $NaHCO_3$/mL
20℃	37℃			20℃	37℃		
9.16	8.77	1	9	10.14	9.90	6	4
9.40	9.12	2	8	10.28	10.08	7	3
9.51	9.40	3	7	10.53	10.28	8	2
9.78	9.50	4	6	10.83	10.57	9	1
9.90	9.72	5	5				

$Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$，相对分子质量=286.2，0.1mol/L溶液含 28.62g/L。

$NaHCO_3$，相对分子质量=84.0，0.1mol/L溶液中含 3.40g/L。

Ca^{2+}，Mg^{2+} 存在时不得使用。

3. 常用组培试剂

（1）组织培养常用植物激素、生长调节物质及一些药品

中文名	英文名	缩写	溶剂	液体试剂的储存
脱落酸	abscisic acid	ABA	NaOH	0℃，现用现配
腺嘌呤	adenine	ADE	H_2O	0~5℃
6-苄基氨基嘌呤	6-benzylaminopurine	BA（6-BA）	HCl / NaOH	常温，2 月
油菜素内酯	brassinolide	BL（BR）	乙醇	0~5℃
2,4-表油菜素内酯	2,4-epirassinolide	24-Epi-BL（24-Epi-BR）	乙醇	0~5℃
矮壮素	chlorocholine chloride	CCC	H_2O	常温
2,4-二氯苯氧乙酸	2,4-dichlorophenoxyacetic acid	2,4-D	NaOH	常温，3 月
2-异戊烯腺嘌呤	2-isopentenyl adenine	2-iP	HCl/NaOH	0℃
赤霉酸（素）	gibberdlin（gibberellic acid）	GA	乙醇	0℃，现用现配
吲哚乙酸	indole-3-acetic acid	IAA	乙醇/NaOH	0℃，1 周
吲哆丁酸	indole-3-butyric acid	IBA	乙醇/NaOH	0℃，1 周
茉莉酸	jasmonic acid	JA	乙醇	常温
激动素	kinetin	KIN（KT）	HCl/NaOH	0℃，2 月
萘乙酸	α-naphthaleneacetk acid	NAA	NaOH	0~5℃，1 周
玉米素	zeatin	ZEA（ZT）	NaOH	0℃
生物素	biotin		NaOH	0℃
秋水仙碱（素）	colchicne		H_2O	0℃
叶酸	folic acid		NaOH	0~5℃
MS 维生素母液			H_2O	0~5℃，1 月
维生素 A			乙醇	0℃
维生素D_3			乙醇	0℃
维生素B_{12}			乙醇	0℃

注：① 配置试剂时，预先以少量（数滴）溶剂溶解药品后再缓缓加水定容，溶剂 NaOH、HCl 的浓度为 1mol/L，乙醇为 95%；② 无菌操作时，ABA、GA、IAA 宜经过滤灭菌；③ 激动素又称为 6-糠基氨基嘌呤（6-furfurylaminopurine）或 6-糠基腺嘌呤（6-furfuryladenine）。

（2）植物组织培养常用的几种基本培养基

（单位：mg/L）

成分	AA	B5	MS	N6	NN	White	WPM
$(NH_4)_2SO_4$		134		463			
NH_4NO_3			1650		720		400
KNO_3		2500	1900	2830	950	80	
$Ca(NO_3)_2$						300	556
$CaCl_2$-H_2O	440	150	440	166	166		96
$MgSO_4$-$7H_2O$	370	250	370	370	185	720	370
Na_2SO_4						200	
K_2SO_4							990
KH_2PO_4	170		170	170	68		170
NaH_2PO_4-H_2O		150				16.5	
KCl	2940						27.8
$FeSO_4$-$7H_2O$	27.8	27.8	27.8	27.8	27.8		37.3

续表

成分	AA	B5	MS	N6	NN	White	WPM
EDTA-Na_2	37.3	37.3	37.3	37.3	37.3		
$Fe_2(SO_4)_3$						2.5	
Sequestrene 330 Fe		28					
KI	0.83	0.75	0.83	0.8		0.75	
$CoCl_2$-$6H_2O$	0.025	0.025	0.025				6.2
H_3BO_3	6.2	3.0	6.2	1.6	10	1.5	0.25
Na_2MoO_4-$2H_2O$	0.25	0.25	0.25		0.25		
MoO_3						0.0001	
$MnSO_4$-$4H_2O$			22.3	3.3	25	7.0	22.3
$MnSO_4$-H_2O	16.9	10					0.25
$CuSO_4$-$5H_2O$	0.025	0.025	0.025		0.025	0.001	8.6
$ZnSO_4$-$7H_2O$	8.6	2	8.6	1.5	10	3.0	100
肌醇（myo-inositol）	100	100	100		100		
烟酰胺（nicotinamide）							0.5
烟酸（nicotinic acid）	0.5	1.0	0.5	0.5	5.0	0.5	
吡哆醇[pyridoxine（HCl）]	0.1	1.0	0.5	0.5	0.5	0.1	1.6
硫胺素[thiamine（HCl）]	0.5	10.0	0.1	1.0	0.5	0.1	
D-泛酸钙（D-calciumpantothenate）						1.0	
叶酸（folic acid）					0.5		
生物素（biotin）					0.05		
谷酰胺（glutamine）	877						
天冬氨酸（aspartic acid）	266						
精氨酸（arginine）	288						
甘氨酸（glycine）	75		2.0	2.0	2.0	3.0	2000
蔗糖（sucrose）	30 000	2000	3000	5000	2000	2000	5.6
pH	5.8	5.5	5.7	5.8	5.5	5.7	

4. 常用酸碱和其他化合物标准及浓度转换

化合物	相对分子质量	比重/（g/mL）	百分浓度/%	摩尔浓度/（mol/L）
HCl	36.46	1.19	36.0	11.7
HNO_3	63.02	1.42	69.5	15.6
H_2SO_4	98.08	1.84	96.0	18.0
CH_3COOH	60.03	1.06	99.5	17.6
NH_4OH	35.04	0.90	58.6	15.1
H_3PO_4	98.00	1.69	85.0	14.7
HCOOH	46.63	1.21	97.0	25.5
$HClO_4$	100.50	1.67	70.0	11.65
2-巯基乙醇	78.13	1.14	100.0	14.6
巯基乙酸	92.12	1.26	80.0	10.9
吡啶	79.10	0.98	100.0	12.4

5. 易变质及需要特殊方法保存的试剂

注意事项		试剂名称举例
需要密封	易潮解吸湿	氧化钙、氢氧化钠、氢氧化钾、碘化钾、三氯乙酸
	易失水风化	结晶硫酸钠、硫酸亚铁、含水磷酸氢二钠、硫代硫酸钠
	易挥发	氨水、氯仿、醚、碘、麝香草酚、甲醛、乙醇、丙酮
	易吸收CO_2	氢氧化钠、氢氧化钾
	易氧化	硫酸亚铁、醚类、酚、抗坏血酸和一切还原剂
	易变质	丙酮酸钠、乙醚和许多生物制品（常需冷藏）
需要避光	见光变色	硝酸银（变黑）、酚（变淡红）、氯仿（产生光气）、茚三酮
	见光分解	（变淡红）
	见光氧化	过氧化氢、氯仿、漂白粉、氰氢酸
需要特殊保管	易爆炸	乙醚、醛类、亚铁盐和一切还原剂
	剧毒	苦味酸、硝酸盐类、过氯酸、叠氮化钠
	易燃	氰化钾（钠）、汞、砷化物、溴
	腐蚀	乙醚、甲醇、丙醇、苯、甲苯、二甲苯、汽油
		强酸、强碱

［General　Information］
书名＝植物生物学与生态学实验
作者＝高玉葆，石福臣编著
页数＝152
SS号＝14076128
DX号＝
出版日期＝2016.07
出版社＝北京科学出版社